



**HAL**  
open science

# Mécanismes de l'angiogénèse bronchique et de la synthèse de VEGF par l'épithélium respiratoire dans les dilatations des bronches.

Clémence Martin

► **To cite this version:**

Clémence Martin. Mécanismes de l'angiogénèse bronchique et de la synthèse de VEGF par l'épithélium respiratoire dans les dilatations des bronches.. Sciences agricoles. Université Paris-Est, 2010. Français. NNT : 2010PEST0030 . tel-00663307

**HAL Id: tel-00663307**

**<https://theses.hal.science/tel-00663307>**

Submitted on 26 Jan 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITE PARIS-EST**

**ECOLE DOCTORALE SVS : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

Présentée par

**Clémence MARTIN**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS-EST**

---

**Mécanismes de l'angiogenèse bronchique et de la  
synthèse de VEGF par l'épithélium respiratoire  
dans les dilatations des bronches**

---

*Thèse dirigée par le Docteur Pierre-Régis BURGEL*

Soutenue le 06 décembre 2010

Devant le jury composé de :

Pr. Daniel DUSSER

Président

Pr. Bruno CRESTANI

Rapporteur

Dr. Lhousseine TOUQUI

Rapporteur

Dr. Estelle ESCUDIER

Examineur

Dr. Pierre-Régis BURGEL

Directeur de Thèse

## RESUME EN FRANCAIS

L'hypervascularisation artérielle bronchique des dilatations des bronches contribue à l'afflux local de cellules inflammatoires et de protéines plasmatiques et favorise la survenue de saignements bronchiques. Les mécanismes de l'angiogenèse des vaisseaux bronchiques dans les dilatations des bronches sont peu connus, mais pourraient impliquer la voie du facteur de croissance endothélial (VEGF)-A.

Nous avons émis l'hypothèse que l'infection bronchique dans les dilatations des bronches contribue à l'angiogenèse des vaisseaux bronchiques. Nous avons développé chez la souris un modèle d'infection bronchique persistante par l'instillation intratrachéale de billes d'agarose contenant du *Pseudomonas aeruginosa*. Nos résultats indiquent que l'infection bactérienne provoque l'angiogenèse des vaisseaux péribronchiques en 7 jours. *P. aeruginosa* induit la synthèse de VEGF-A par l'épithélium respiratoire in vitro et chez la souris par l'activation du récepteur de l'épidermal growth factor (EGF).

Nous avons ensuite évalué l'effet de la perte de fonction de CFTR, l'anomalie caractéristique de la mucoviscidose (une cause génétique de dilatations des bronches), sur l'angiogenèse bronchique et l'expression de facteurs pro-angiogéniques. Ces études ont été menées à partir de poumons de patients mucoviscidosiques, chez des souris mutées pour le gène *cfr* et par inhibition de CFTR sur des cultures de cellules épithéliales.

Nos données indiquent que l'infection bronchique contribue à l'angiogenèse péribronchique, qui nécessiterait une communication épithélium/endothélium. L'épithélium bronchique de la mucoviscidose est dans un état pro-angiogénique en l'absence d'infection.

**TITRE EN ANGLAIS**

**Mechanisms of bronchial angiogenesis and VEGF airway epithelial synthesis in bronchiectasis: Roles of *Pseudomonas aeruginosa* bronchial infection and CFTR defect.**

## RESUME EN ANGLAIS

Abnormal proliferation of bronchial arteries in subjects with bronchiectasis contributes to the recruitment of inflammatory cells and plasma protein within the airways, and promotes endobronchial bleeding. Mechanisms of bronchial angiogenesis in bronchiectasis are largely unknown, but could implicate the vascular endothelial growth factor (VEGF)-A pathway.

We hypothesized that bronchial infection that occurs in bronchiectasis contributes to angiogenesis of bronchial blood vessels. We developed a mouse model of persistent bronchial infection by intratracheal instillation of agarose beads containing *Pseudomonas aeruginosa*. Our results indicate that bacterial infection promotes angiogenesis of peribronchial blood vessels within 7 days. Further, *P. aeruginosa* induces VEGF-A synthesis in airway epithelium in vitro and in mouse in vivo via activation of the epidermal growth factor (EGF) receptor.

Next we examined the role of CFTR defect, associated with cystic fibrosis (CF, a genetic cause of bronchiectasis), on bronchial angiogenesis and expression angiogenic growth factors. These studies were conducted using lung tissues obtained in CF subjects, in various strains of mice mutated for the *cftr* gene, and by inhibition of CFTR function in cultured airway epithelial cells.

Our data indicates that bronchial infection contributes to peribronchial angiogenesis, which probably necessitate interaction of epithelial and endothelial cells. Cystic fibrosis airway epithelium may exhibit a pro-angiogenic phenotype in the absence of infection.

## **MOTS CLES EN FRANCAIS**

Angiogenèse

Epithélium respiratoire

Infection bactérienne

Vascular endothelial growth factor

Epidermal growth factor

Mucoviscidose

## **MOTS CLES EN ANGLAIS**

Angiogenesis

Airway epithelium

Bacterial infection

Vascular endothelial growth factor

Epidermal growth factor

Cystic fibrosis

Ce travail de Recherche a été réalisé sous la direction du Dr. Pierre-Régis Burgel, au sein de **l'Unité de Physiologie et Physiopathologie de la Respiration UPRES EA 2511**, dirigée par le Pr. Isabelle Fajac à l'Université Paris Descartes, Hôpital Cochin.

**Adresse** : 24, rue du faubourg Saint Jacques, 75014 Paris.



## REMERCIEMENTS

Je remercie Pierre-Régis pour sa force de travail communicative, sa patience et la confiance qu'il m'a portée pendant ces années de Thèse. Je le remercie aussi pour son soutien et l'amitié sans faille qu'il m'a toujours offerts.

Je remercie Guiti pour son indulgence et sa gentillesse en rapport avec mon caractère exigeant et trempé et je la remercie aussi pour tout le réconfort qu'elle m'a toujours apporté.

Je remercie Madame le Pr Isabelle Fajac pour sa compréhension et son soutien.

Je remercie Monsieur le Pr Daniel Dusser pour son attitude bienveillante, sa confiance, l'accueil qu'il m'a réservé dans son service et l'exemple qu'il représente à mes yeux.

Je remercie Jeanne pour sa présence, la complicité que nous partageons et pour le travail qu'elle a réalisé lors de son M2 au laboratoire et qui a contribué grandement à la finalisation de cette Thèse.

Je remercie Nathalie, Sophie et Julie pour leurs travaux réalisés lors de stages de M2 au laboratoire qui ont contribué à la réalisation de cette Thèse.

Je remercie Asmaa Tazi (Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Cochin, Pr Claire Poyart) sans qui le versant bactériologique de ce travail n'aurait probablement pas vu le jour.

Je remercie Monsieur le Pr Anh-Tuan Dinh-Xuan qui m'a accueillie avec bienveillance dans son laboratoire et son service d'EFR.

Je remercie Kévin et mon père qui sont les deux piliers de mon existence et qui me donnent la force d'aller plus loin, poussée par la confiance qu'ils me portent.

Je remercie Sylvie de m'accompagner dans un moment de vie injuste et difficile. Elle le fait courageusement et dignement, elle a tout mon respect.

Je remercie Véronique pour sa générosité, son amitié et aussi parce qu'elle me connaît si bien.

Je remercie mes amis, Makoto, Gachoucha, Reem, Aurélie, Cécile, Salah, Marion V., Cristiano et Silvia, Marion R., Daphné et mes sœurs Sophie et Mathilde qui ont toujours été présents et ont eu le courage d'affronter une situation dans laquelle tout le monde se sent irrémédiablement inutile.

Je remercie mes parents pour m'avoir donné l'opportunité de m'exprimer librement et de penser par moi-même sans me soucier des conséquences que cela puisse avoir.

Je remercie mes grands parents, mémé Lucie et pépé Albert, pour m'avoir transmis le respect du travail, la loyauté, l'importance de l'humanité et de la confiance en soi.

***Kévin mon Amour, je te dédie cette Thèse à laquelle tu as toujours attaché beaucoup d'importance et d'intérêt, car sans Toi, sans ton Amour, ton courage, ta ténacité et ta force je n'aurais jamais eu l'envie d'aller plus loin.***

# **TABLE DES MATIERES**

<b><u>LISTE DES ABBREVIATIONS</u></b>	<b>14</b>
<b><u>INTRODUCTION</u></b>	<b>15</b>
<b>I. LES DILATATIONS DES BRONCHES</b>	<b>16</b>
<b>1. Définition, étiologies, diagnostic</b>	<b>16</b>
<b>2. Complication des dilatations des bronches :</b>	<b>18</b>
<i>L'infection bronchique chronique</i>	
<b>3. Complication des dilatations des bronches :</b>	<b>20</b>
<i>Les hémoptysies</i>	
<b>II. LA VASCULARISATION BRONCHIQUE ET PULMONAIRE</b>	<b>22</b>
<b>1. Anatomie de la circulation bronchique</b>	<b>23</b>
a. La circulation bronchique humaine	23
b. La circulation bronchique chez la souris	25
<b>2. Rôles de la circulation bronchique</b>	<b>25</b>
a. Oxygénation et nutrition	26
b. Défense immunitaire et maintien de l'intégrité de l'hôte	26
c. Réchauffement et humidification de l'air inspiré	27
d. Clairance muco-ciliaire et absorption de molécules inhalées	27
e. Compensation de la circulation pulmonaire	28
f. Echanges gazeux	28
<b>III. ANGIOGENESE</b>	<b>29</b>
<b>1. Mécanismes généraux de l'angiogenèse</b>	<b>29</b>
a. Vasodilatation, perméabilité endothéliale et implication périendothéliale	31
b. Prolifération endothéliale et migration	31
<b>2. Angiogenèse de la circulation artérielle bronchique</b>	<b>32</b>
<b>3. Le VEGF et ses récepteurs</b>	<b>34</b>
a. Biologie du VEGF (VEGF-A)	34
b. Les Récepteurs du VEGF : VEGFR1 et VEGFR2	35
<b>4. Angiogenèse artérielle bronchique dans les pathologies bronchiques chroniques</b>	<b>36</b>
a. Asthme	37
b. BPCO	38
c. Dilatations des bronches et mucoviscidose	39

<b>IV. RECEPTEUR DE L'EPIDERMAL GROWTH FACTOR (EGFR) ET IMMUNITE INNEE ANTIBACTERIENNE</b>	<b>41</b>
<b>1. Introduction</b>	<b>41</b>
<b>2. Implication de l'EGFR dans la défense épithéliale innée</b>	<b>43</b>
<b>3. Cascade moléculaire impliquant l'EGFR en réponse à une agression</b>	<b>44</b>
<b>4. Récepteur de l'EGF et synthèse de VEGF</b>	<b>46</b>
<b><u>ETUDES</u></b>	<b>48</b>
<b>I. L'INFECTION BRONCHIQUE A <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> INDUIT LA SYNTHESE DE VEGF PAR L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i> CHEZ LA SOURIS : <i>RELATION AVEC L'ANGIOGENESE BRONCHIQUE.</i></b>	<b>49</b>
<b>1. Introduction</b>	<b>49</b>
<b>2. Modèle animal d'infection bactérienne bronchique prolongée</b>	<b>51</b>
a. Préambule	<b>51</b>
b. Protocoles	<b>52</b>
• Préparation des billes d'agarose	<b>52</b>
• Choix des souris	<b>54</b>
• Instillation des souris	<b>55</b>
• Traitement des souris	<b>55</b>
• Sacrifice des souris	<b>56</b>
c. Un modèle d'infection bronchique prolongée	<b>58</b>
• Résultats bactériologiques	<b>58</b>
• Résultats histologiques	<b>59</b>
<b>3. Article en révision dans l'European Respiratory Journal</b>	<b>62</b>
a. Abstract	<b>63</b>
b. Introduction	<b>64</b>
c. Methods	<b>66</b>
d. Results	<b>72</b>
e. Discussion	<b>76</b>
f. Figures	<b>80</b>
<b>4. Commentaires de l'éditeur et des lecteurs de l'European Respiratory Journal</b>	<b>86</b>

<b>5. Données complémentaires</b>	<b>93</b>
a. Caractérisation des produits contenus dans le surnageant de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et impliqués dans la synthèse de VEGF-A	<b>93</b>
b. Implication des autres bactéries dans la synthèse de VEGF par les cellules NCI-H292	<b>95</b>
c. Expériences en cours et perspectives	<b>98</b>
• Rôle du LPS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans la synthèse de VEGF	<b>98</b>
• Effet du surnageant vs Effet des bactéries vivantes	<b>99</b>
• Perspectives sur notre modèle animal d'infection bronchique persistante par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>99</b>
<b>II. ANGIOGENESE BRONCHIQUE DE LA MUCOVISCIDOSE :</b>	
<b>ROLE DE CFTR DANS L'EXPRESSION DU VEGF ET DE SES RECEPTEURS</b>	
<b>PAR L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE</b>	<b>101</b>
1. Introduction	<b>101</b>
2. Méthodes	<b>106</b>
3. Résultats	<b>118</b>
4. Discussion	<b>131</b>
<b><u>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES IMMEDIATES</u></b>	<b>136</b>
<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b>	<b>139</b>
<b><u>CURRICULUM VITAE</u></b>	<b>148</b>

## LISTE DES ABBREVIATIONS

BPCO : Bronchopneumopathie chronique obstructive  
CFTR: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator  
CVF: Capacité vitale forcée  
DMSO: Diméthyl sulfoxyde  
EGFR: Epidermal growth factor receptor  
ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay  
Flt-1: fms-like tyrosine kinase 1, Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-1  
Flk-1: fetal liver kinase 1, Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-2  
LBA: Lavage broncho-alvéolaire  
LTA: Acide lipotéchoïque  
NO: Nitric oxide  
PA : *Pseudomonas aeruginosa*  
PAO1: *Pseudomonas aeruginosa* de la souche PAO1  
PA<sub>sup</sub>: Surnageant de culture de *Pseudomonas aeruginosa*  
PBS: Phosphate buffered saline  
PGN : Peptidoglycane  
PIGF: Facteur de croissance placentaire  
PMB: Polymixine B  
rpm: Round per minute  
RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium, milieu de culture cellulaire  
SA : Staphylococcus aureus  
Souris *Cftr* +/+ : souris C57BL/6J *Cftr*<sup>m1UNC</sup> sauvage  
Souris *Cftr* -/- : souris C57BL/6J *Cftr*<sup>m1UNC</sup> invalidée pour le gène *cftr*  
Souris *F508 wt/wt*: souris *Cftr*<sup>tm1Eur</sup> sauvage  
Souris *F508 del/del*: souris *Cftr*<sup>tm1Eur</sup> avec délétion homozygote de la phénylalanine en position 508 du gène *cftr*  
TSBD : Trypticase Soy Broth Dialysate  
VEGF-A: Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire  
VEGFR: Récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire  
VEMS: Volume expiratoire maximal la première seconde  
VPF : Vascular permeability factor  
vWF: Facteur von Willebrand

# **INTRODUCTION**



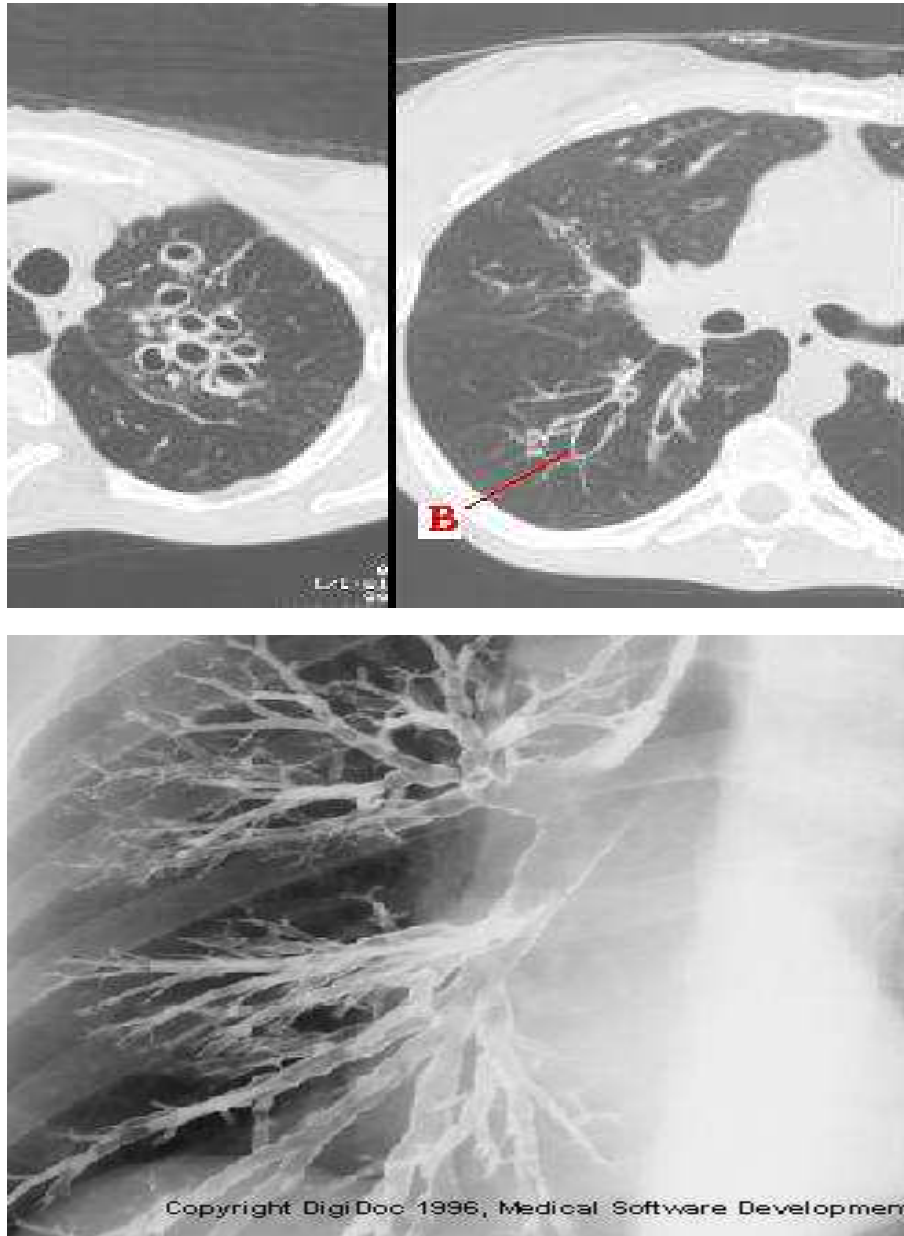
## **I. LES DILATATIONS DES BRONCHES**

### **1. Définition, étiologies, diagnostic.**

Les dilatations des bronches font partie des pathologies bronchiques chroniques. La première description des dilatations des bronches a été effectuée par Laënnec (1819) et la définition n'a pas variée depuis cette époque : il s'agit d'une augmentation permanente et irréversible du calibre bronchique. Les étiologies sont différentes selon que les dilatations des bronches sont localisées à un seul lobe pulmonaire ou diffuses (c'est à dire touchant plus de deux lobes). Dans le cadre des dilatations des bronches diffuses, on retrouve des pathologies génétiques (mucoviscidose, dyskinésie ciliaire primitive) mais également des pathologies systémiques telles que les connectivites (par exemple la polyarthrite rhumatoïde et la maladie de Gougerot-Sjögren) ainsi que les déficits immunitaires (déficit en immunoglobulines innés ou acquis). Les atteintes localisées sont fréquemment liées à des séquelles de maladies respiratoires anciennes (tuberculose pulmonaire, pneumonies sévères de l'enfance). Cette liste d'étiologies n'est pas exhaustive. Les causes de dilatations des bronches peuvent être trouvées dans une revue de la littérature récemment publiée [1].

Le diagnostic de dilatations de bronches repose actuellement sur la réalisation d'un scanner thoracique en haute résolution. Cet examen non-invasif permet la visualisation directe de bronches de calibre anormal : la bronche est de diamètre plus important que le vaisseau sanguin satellite. Cet examen a permis la reconnaissance de la fréquence importante des dilatations des bronches et rendu obsolète l'examen invasif qu'était la bronchographie lipiodolée. Des images caractéristiques de scanner thoracique et de bronchographie chez des patients atteints de dilatations des bronches sont présentées sur la figure 1.

**Figure 1 : Le diagnostic de dilatations des bronches par scanner (en haut) et par bronchographie lipiodolée (en bas)**



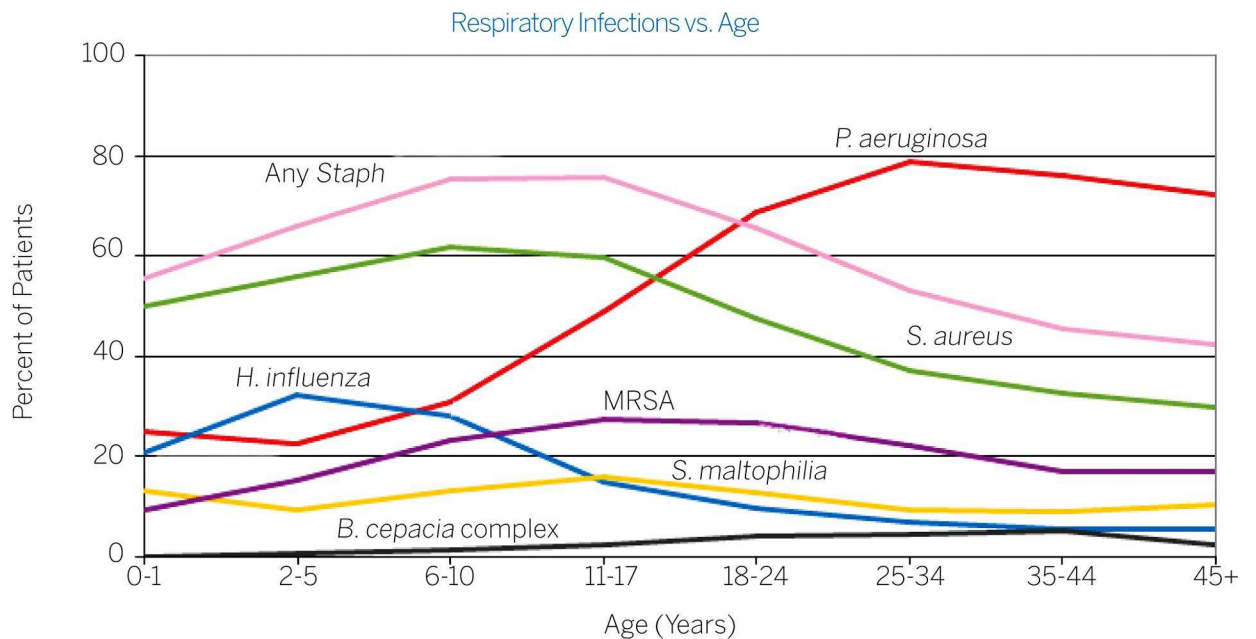
**Légende.** En haut : Coupe scanographique de poumon atteint de dilatations des bronches. On observe une augmentation de l'épaisseur de la paroi et du calibre des bronches (flèche). En bas : Bronchographie au Lipiodol qui montre une atteinte de tout l'arbre bronchique avec des dilatations des bronches jusqu'en distalité et un aspect dit en « collier de perles ».

## 2. Complications des dilatations des bronches : l'infection bronchique chronique.

L'histoire naturelle des dilatations des bronches est caractérisée par la survenue d'infections bactériennes bronchiques récurrentes pouvant éventuellement conduire à une infection bronchique chronique. Dans ce dernier cas, les antibiotiques ne permettent plus l'éradication des bactéries des sécrétions bronchiques. La présence de bactéries dans les voies aériennes, qui sont habituellement considérées comme stériles, induit une réponse de l'hôte et contribue à l'aggravation des modifications structurelles des voies aériennes. L'obstruction de la lumière bronchique par des sécrétions (mucus) et des cellules inflammatoires, ainsi que les modifications de l'épaisseur de la paroi des bronches sont les principaux mécanismes conduisant à l'altération de la fonction respiratoire qui peut évoluer vers l'insuffisance respiratoire.

Les bactéries sont les principaux agents pathogènes retrouvés dans les sécrétions bronchiques des patients atteints de dilatations des bronches. Ces bactéries sont différentes en fonction des étiologies : dans les déficits immunitaires, les dyskinésies ciliaires et les dilatations des bronches séquellaires, les principales bactéries identifiées sont *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* [1]. L'infection par *Pseudomonas aeruginosa* est plus inconstante et souvent tardive dans l'évolution de ces pathologies. Chez les patients atteints de mucoviscidose, les bactéries infectant les voies aériennes évoluent au cours de la vie. Dans l'enfance, *Haemophilus influenzae* est la principale bactérie identifiée alors qu'à l'âge adulte environ 70% des patients sont infectés chroniquement par *Pseudomonas aeruginosa* et que la deuxième espèce bactérienne la plus fréquente est *Staphylococcus aureus* [2].

**Figure 2 : Evolution des pathogènes responsables de l'infection bronchique chez les patients mucoviscidosiques en fonction de l'âge (d'après [2]).**



MRSA : Staphylococcus (Staph) aureus résistant à la méticilline.

Dans la mucoviscidose et dans les dilatations des bronches d'autres étiologies, l'infection chronique à *Pseudomonas aeruginosa* constitue toujours un tournant important. Elle est habituellement associée à une fréquence plus importante des exacerbations respiratoires et à un déclin plus rapide de la fonction respiratoire. Les raisons de la persistance de *Pseudomonas aeruginosa* dans les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose sont mal comprises [3]. L'une des raisons avancées est la persistance du *Pseudomonas* au sein de bouchons de mucus dans la lumière bronchique. Ainsi, la détection immuno-histochimique de *Pseudomonas aeruginosa* dans les bronches des patients a montré que cette bactérie était retrouvée principalement sous la forme de macrocolonies dans les bouchons de mucus à distance de l'épithélium [4]. Les modifications phénotypiques du *Pseudomonas aeruginosa* qui devient mucoïde dans le microenvironnement hypoxique des bouchons de mucus serait l'un des facteurs majeurs impliqués dans la persistance de l'infection [4]. L'une des implications majeures de ces données est que *Pseudomonas* est à distance de l'épithélium et

produirait donc ses effets pro-inflammatoires par l'intermédiaire de facteurs sécrétés plutôt que par un contact direct avec l'épithélium.

### **3. Complications des dilatations des bronches : les hémoptysies.**

Parmi les complications aiguës survenant chez les patients atteints de dilatations des bronches, les hémorragies intrabronchiques (ou hémoptysies) sont particulièrement redoutées. Ces saignements ont le plus souvent pour origine la circulation artérielle bronchique qui est une circulation à haut débit (voir plus bas). Les hémoptysies de faible abondance (expectorations striées de sang ou émission de quelques crachats sanglants) sont des événements fréquents et souvent bénins. L'évolution est néanmoins imprévisible et la survenue d'hémoptysies massive est toujours redoutée car elle peut entraîner le décès par inondation des alvéoles pulmonaires et l'asphyxie. L'expérience acquise chez des patients ayant des dilatations des bronches dans le cadre de la mucoviscidose, indique que cette complication survient surtout lorsque l'atteinte pulmonaire est avancée, lorsque le patient présente une infection bronchique chronique à *Pseudomonas aeruginosa* ou à *Staphylococcus aureus* et le plus souvent à l'occasion d'une exacerbation infectieuse [5].

L'analyse des images radiographiques réalisées lors d'artériographies bronchiques pour le traitement des hémoptysies de moyenne à grande abondance indique la présence d'une vascularisation artérielle bronchique pathologique. La présence d'artères bronchiques dilatées, tortueuses se terminant par un enchevêtrement de vaisseaux bronchiques de petite taille suggère une angiogenèse de la circulation artérielle bronchique.

**Figure 3 : Image d'artériographie avant une embolisation pour hémoptysie chez un patient mucoviscidosique.**



**Légende :** L'injection de produit de contraste iodé par un cathéter positionné directement dans l'artère bronchique (en bas à droite) révèle la présence d'artères bronchiques de gros calibre tortueuses se prolongeant par un réseau de vaisseaux anormaux de petite taille d'aspect « chevelu ». Bien que les mécanismes conduisant à la survenue d'hémoptysies à partir de ces vaisseaux soient inconnus, certains auteurs ont suggéré une déstabilisation de l'architecture des vaisseaux à l'occasion d'épisodes d'exacerbation respiratoire d'origine infectieuse [5].

## II. LA VASCULARISATION BRONCHIQUE ET PULMONAIRE

Deux circulations coexistent dans le poumon [6, 7] : la circulation pulmonaire et la circulation bronchique. Ces deux circulations se différencient par leurs fonctions et leurs régimes de pression. La circulation pulmonaire a pour fonction d'oxygéner le sang veineux de tout l'organisme afin qu'il soit redistribué via le cœur gauche, en aval du poumon. C'est une circulation à basse résistance et haute capacitance.

La circulation artérielle bronchique fait partie de la vascularisation systémique et a pour principale fonction d'apporter de l'oxygène et des nutriments aux voies aériennes de conduction (bronches, bronchioles) ainsi qu'aux ganglions lymphatiques régionaux, aux nerfs, aux parois des artères pulmonaires et à la plèvre viscérale. Les artères bronchiques sont des branches de l'aorte et transportent donc du sang artériel en provenance du cœur gauche. La circulation bronchique est connue depuis le 17<sup>ème</sup> siècle, où elle fut décrite pour la première fois par Ruyisch. La circulation bronchique ne reçoit qu'un à 2% du débit cardiaque chez les sujets sains. Son petit volume, sa faible participation à la distribution du débit cardiaque et son anatomie variable rendent son étude difficile. Il est clairement établi que malgré son petit volume elle opère un rôle déterminant dans le maintien de l'intégrité pulmonaire [7]. C'est une circulation à haute résistance et basse capacitance. Dans les paragraphes ci-dessous, nous détaillons l'anatomie et la physiologie du fonctionnement des artères bronchiques.

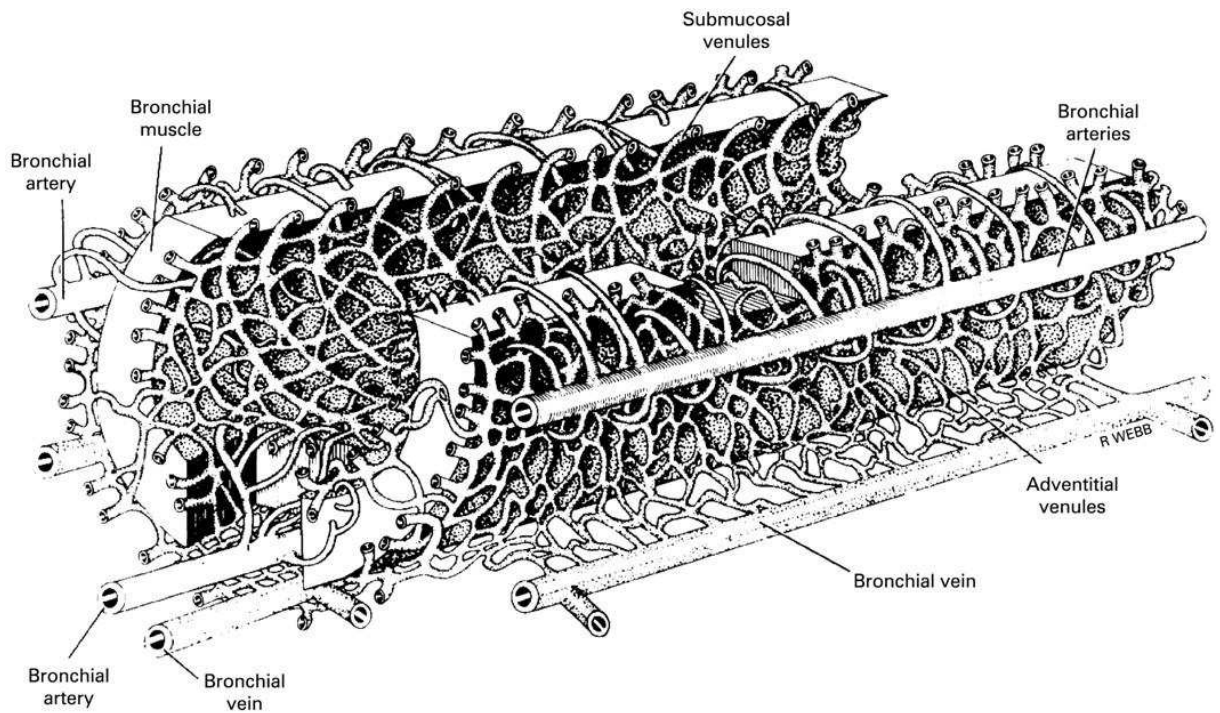
## **1. Anatomie de la circulation bronchique**

### **a. La circulation bronchique humaine**

Chez l'homme, le développement embryologique de la circulation artérielle bronchique débute dès la 4<sup>ème</sup> semaine de gestation quand les artères bronchiques primitives se développent à partir de l'aorte dorsale au niveau du cou. Ces artères bronchiques primitives sont secondairement supplantées par les artères bronchiques définitives et disparaissent. Les artères bronchiques définitives se développent à partir de l'aorte thoracique entre T5 et T6 à partir des 9-12<sup>ème</sup> semaines de gestation. La circulation artérielle bronchique fait partie de la circulation systémique au départ de l'aorte. Il existe une très grande variabilité anatomique inter et même intra-espèces. Cependant, chez l'homme, dans 30% des cas, il existe 2 artères bronchiques dont chacune prend en charge un poumon et au moins l'une d'entre elles prend source au niveau de l'aorte, la seconde pouvant être formée à partir des artères intercostales ou plus rarement à partir de l'artère mammaire interne ou des artères coronaires. Ces deux artères rejoignent les bronches souches au niveau du hile pulmonaire et se divisent à partir de là en deux ou trois branches suivant la segmentation bronchique en s'enroulant autour des bronches. Elles se divisent ensuite en vaisseaux plus petits qui s'anastomosent et forment un plexus artériel péribronchique : elles forment des petites artéioles qui pénètrent la musculature péribronchique afin de rejoindre la muqueuse et former à ce niveau un plexus sous-muqueux. Ces plexus reçoivent 60 à 85% du débit sanguin total de la circulation artérielle bronchique. Certaines artéioles vont également rejoindre la plèvre viscérale.



**Figure 3 : Représentation schématique de la circulation bronchique illustrant l'existence des plexus adventitiels et sous-muqueux. Dessin reproduit à partir la référence [7].**



On considère qu'environ  $\frac{2}{3}$  du sang en provenance des capillaires bronchiques est drainé dans des anastomoses ou des vaisseaux communicants (shunts) qui rejoindraient les veines pulmonaires formant ainsi la **circulation broncho-pulmonaire**. Les veinules sous-muqueuses et adventitielles rejoignent les veines bronchiques qui se vident dans la veine azygos et héli-azygos. La majeure partie du sang veineux bronchique est drainé directement dans la circulation pulmonaire grâce aux anastomoses sus-décrites.

## **b. La circulation bronchique chez la souris**

L'existence de la circulation bronchique chez la souris est attestée par la réalisation de moulages vasculaires (« vascular casts ») en injectant des microsphères dans l'aorte après occlusion de la circulation pulmonaire [8]. Il existe des différences anatomiques importantes dans la circulation bronchique entre l'homme et la souris : Chez la souris, les vaisseaux sanguins systémiques, qui vascularisent la trachée et les bronches, ne pénètrent pas les voies de conduction aériennes intra-parenchymateuses comme c'est le cas chez l'homme.

La plasticité de la circulation bronchique, c'est-à-dire sa capacité à proliférer en réponse à des stimulations, a été démontrée dans des modèles expérimentaux variés. Par exemple, la ligature de la circulation pulmonaire chez la souris provoque une prolifération des artères bronchiques à partir des vaisseaux pleuraux périphériques en 5 à 6 jours [9]. La surexpression épithéliale du vascular endothelial growth factor (VEGF)-A provoque un doublement de la densité vasculaire trachéale en 7 jours [10, 11]. La souris, malgré ses différences anatomiques avec l'homme, permet donc d'étudier l'angiogenèse bronchique.

### **2. Rôles de la circulation bronchique.**

La fonction principale de la circulation bronchique est l'oxygénation et l'apport de nutriments aux parois des voies aériennes de conduction. La circulation bronchique pourrait avoir de nombreux autres rôles. Nous discutons ci-dessous les données actuelles sur les rôles physiologiques et physiopathologiques de la circulation bronchique.

### **a. Oxygénation et nutrition**

La fonction principale de la circulation bronchique est d'assurer la vascularisation, la nutrition et l'oxygénation des parois des voies aériennes de conduction ainsi que des ganglions lymphatiques régionaux, des nerfs, des parois des artères pulmonaires et de la plèvre viscérale. Son rôle est mis en évidence dans les cas d'interruption de l'apport sanguin artériel bronchique. Lors des cures chirurgicales d'atrésie pulmonaire on observe des lésions de nécrose de la muqueuse bronchique en rapport avec l'interruption de l'apport sanguin à la paroi bronchique. Des lésions d'ischémie trachéale sont aussi retrouvées chez des patients transplantés pulmonaires, notamment lors des transplantations bi-pulmonaires car la trachée ne bénéficie pas d'une compensation vasculaire par la circulation pulmonaire. L'ischémie trachéale n'est en général pas observée lors des transplantations mono-pulmonaires où la trachée est conservée dans son entier : la circulation vasculaire pulmonaire peut compenser une obstruction de la circulation bronchique grâce à la circulation broncho-pulmonaire.

### **b. Défense immunitaire et maintien de l'intégrité de l'hôte.**

La vascularisation bronchique pourrait participer aux défenses de l'organisme contre les agressions épithéliales provoquées par les agents inhalés (particules, microorganismes). La restauration d'une vascularisation appropriée dans un tissu qui a été soumis à une agression permet non seulement l'apport d'oxygène mais également l'afflux local de cellules inflammatoires et de protéines plasmatiques visant à rétablir l'intégrité de l'hôte [12, 13]. Léonard de Vinci a été le premier à observer l'apparition de néo-vaisseaux autour des foyers d'infection pulmonaire (notamment autour des abcès pulmonaires) [14]. Cette constatation déjà ancienne est en faveur d'un rôle de la circulation bronchique systémique dans l'immunité anti-bactérienne et la réparation broncho-pulmonaire.

### **c. Réchauffement et humidification de l'air inspiré**

La vascularisation bronchique participe à l'humidification et au réchauffement de l'air alvéolaire, tenant ainsi un rôle comparable à celui de la vascularisation de la muqueuse des fosses nasales. Les modifications de l'hydratation et de la température de l'air inspiré ainsi que celles du débit cardiaque ont des conséquences sur la circulation bronchique variables selon les espèces. Chez le mouton et le chien, la ventilation avec un air sec entraîne une augmentation du débit sanguin bronchique, alors que chez l'homme elle reste sans effet. Chez le chien, un air inspiré froid n'a pas d'effet sur le débit sanguin bronchique alors que l'inspiration d'air froid chez l'homme augmente le débit sanguin bronchique lors d'une hyperventilation mais pas lors d'une respiration calme. Un exercice physique modéré, responsable d'une augmentation du débit cardiaque, augmente le débit sanguin bronchique chez l'homme.

### **d. Clairance muco-ciliaire et absorption de molécules inhalées**

L'escalator muco-ciliaire de l'épithélium bronchique permet l'élimination des particules et des micrororganismes inhalés. Cette fonction de clairance des agents inhalés est en partie dépendante de la perfusion et du débit sanguin bronchique. Par ailleurs, il existe aussi un passage transépithélial direct de certaines substances et petites particules solubles dans la vascularisation systémique par les capillaires bronchiques. Une étude conduite chez le mouton a montré que lors d'une inhalation de  $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ , 18% de la quantité administrée était récupérée via les capillaires sous-épithéliaux bronchiques. Cette observation permet notamment l'administration de médicaments inhalés qui sont alors délivrés directement dans la circulation systémique évitant ainsi un premier passage hépatique.

#### **e. Compensation de la circulation pulmonaire**

Grace à un réseau très développé de connections anastomotiques et donc de circulations collatérales, la circulation bronchique permet de prévenir les infarctus pulmonaires lors d'un phénomène embolique interrompant la circulation pulmonaire. La circulation bronchique permet de limiter les phénomènes d'infarctus pulmonaire en assurant un soutien nutritionnel à la circulation pulmonaire qui peut assurer ainsi son rôle de filtre pulmonaire protégeant les organes d'aval beaucoup plus sensibles comme le cerveau et le cœur des phénomènes emboliques.

#### **f. Echanges gazeux**

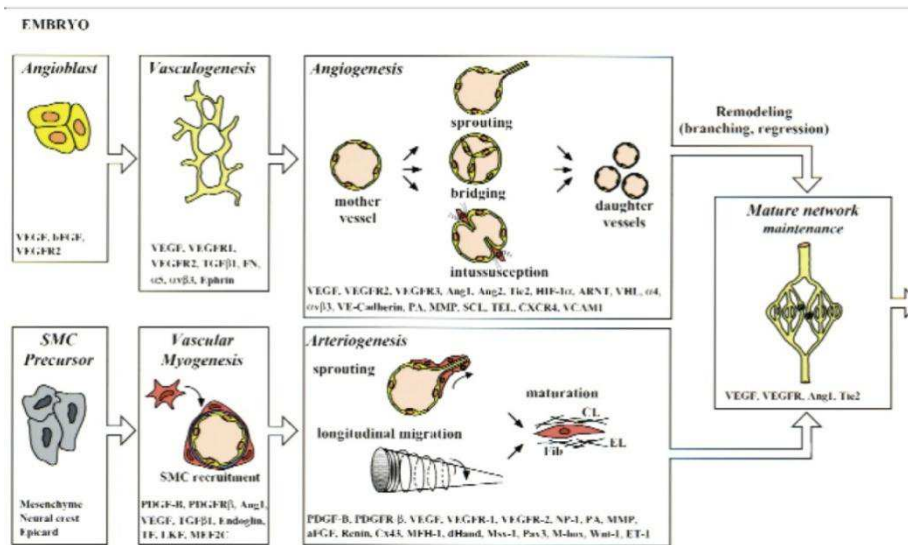
La participation de la circulation bronchique aux échanges gazeux est très faible en conditions normales. Cependant, grâce aux anastomoses et à la circulation collatérale, la circulation bronchique peut contribuer aux échanges gazeux lorsque le débit pulmonaire est chroniquement diminué voir interrompu. C'est le cas de l'atrésie pulmonaire où l'on observe une dilatation compensatrice des artères bronchiques. Ce phénomène est aussi observé lors de ligatures ou d'obstructions de la circulation pulmonaire qui provoquent une expansion de la circulation bronchique contribuant significativement aux échanges gazeux pouvant rendre compte d'environ 40% de la clairance du CO<sub>2</sub>. Cette dilatation compensatrice de la circulation bronchique est réversible lorsque les conditions normales de circulation pulmonaires sont rétablies. Cette capacité d'échange gazeux est limitée aux gaz très solubles tels que le CO, le NO et le CO<sub>2</sub>, mais très peu à l'oxygène sauf en cas de désaturation profonde du sang artériel. Cette plasticité compensatrice de la circulation bronchique peut aussi se voir dans des conditions d'hypoxémie chronique avec une augmentation du débit sanguin des anastomoses et des artères bronchiques chez les patients ayant une insuffisance respiratoire chronique.

### III. ANGIOGENESE

#### 1. Mécanismes généraux de l'angiogenèse

La formation des vaisseaux sanguins chez l'embryon fait intervenir la vasculogénèse et l'angiogenèse. La vasculogénèse correspond au développement d'un vaisseau sanguin lié à la différenciation *in situ* d'une cellule précurseur en cellule endothéliale qui se multiplie pour former un groupe de cellules puis un réseau vasculaire primitif. L'angiogenèse correspond classiquement à la croissance de vaisseaux sanguins par bourgeonnement à partir de vaisseaux préexistants. Plus récemment le terme d'angiogenèse se rapporte non seulement à la croissance de vaisseaux mais aussi à l'apparition de modifications structurales sur ces vaisseaux. La vasculogénèse et l'angiogenèse ne sont pas suffisantes à elles seules pour la formation de vaisseaux matures, car elles n'intègrent pas l'étape cruciale du recrutement des cellules péri-endothéliales (la musculogénèse vasculaire) formant les différentes couches circonférentielles bordant le vaisseau dont la musculature (artériogénèse). Le rôle des cellules péri-endothéliales, est de stabiliser, renforcer et poursuivre la différenciation du vaisseau en fonction des facteurs environnementaux. Les phénomènes de vasculogénèse/angiogenèse et de musculogénèse vasculaire/artériogénèse sont des étapes de développement parallèles qui aboutissent à la formation d'un vaisseau fonctionnel mature.

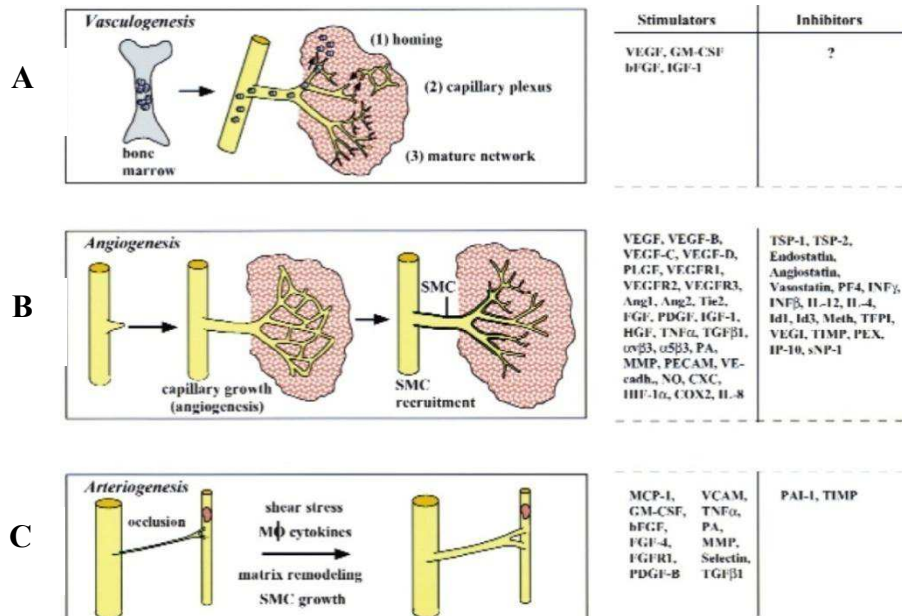
**Figure 4 : Les étapes de la croissance vasculaire chez l'embryon**



**Légende :** Les précurseurs endothéliaux (angioblastes) embryonnaires s'assemblent pour former un réseau vasculaire primitif (vasculogénèse) qui s'étend et se modifie (angiogénèse). Les cellules musculaires lisses rejoignent les cellules endothéliales, les entourent (musculogénèse vasculaire) puis stabilisent et protègent le vaisseau (artériogénèse).

Chez l'adulte, la croissance vasculaire peut se faire par des mécanismes distincts :

**Figure 5 : Les mécanismes de la croissance vasculaire chez l'adulte**



**Légende :** La formation pathologique de vaisseaux chez l'adulte peut survenir *via* une vasculogénèse (A) : mobilisation et migration de cellules précurseurs (angioblastes) ; une angiogénèse (B) : remodelage et bourgeonnement : ou une artériogénèse (C) : croissance

vasculaire collatérale. L'angiogenèse est un mécanisme majeur de formation de nouveaux vaisseaux sanguins chez l'adulte. Les différentes étapes de l'angiogenèse aboutissant à la formation de néo-vaisseaux ont largement été étudiées et fait l'objet de l'article de synthèse [15, 16].

#### **a. Vasodilatation, perméabilité endothéliale et implication péri-endothéliale.**

L'angiogenèse débute par une vasodilatation dépendante du monoxyde d'azote (NO). Le VEGF induit une augmentation de la perméabilité vasculaire permettant une extravasation de protéines plasmatiques formant une base d'accueil pour les cellules endothéliales migrantes. Cette augmentation de la perméabilité vasculaire se fait par un mécanisme de fenestration de la paroi vasculaire. Un des médiateurs suspecté de jouer un rôle dans ce mécanisme est l'angiopoïétine 2 (Ang2) qui inhibe la voie du récepteur Tie2 dont le ligand, l'angiopoïétine 1 (Ang1) favorise au contraire, l'adhésion cellulaire et la stabilité des vaisseaux sanguins. Ce phénomène implique également la redistribution de molécules d'adhésion cellulaire telles que la platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1) et la vascular endothelial cadherine (VE-cadherin). Pour ce faire, les liaisons cellulaires endothéliales mais aussi matricielles doivent être en partie détruites, suggérant la nécessité de l'intervention de métalloprotéinases.

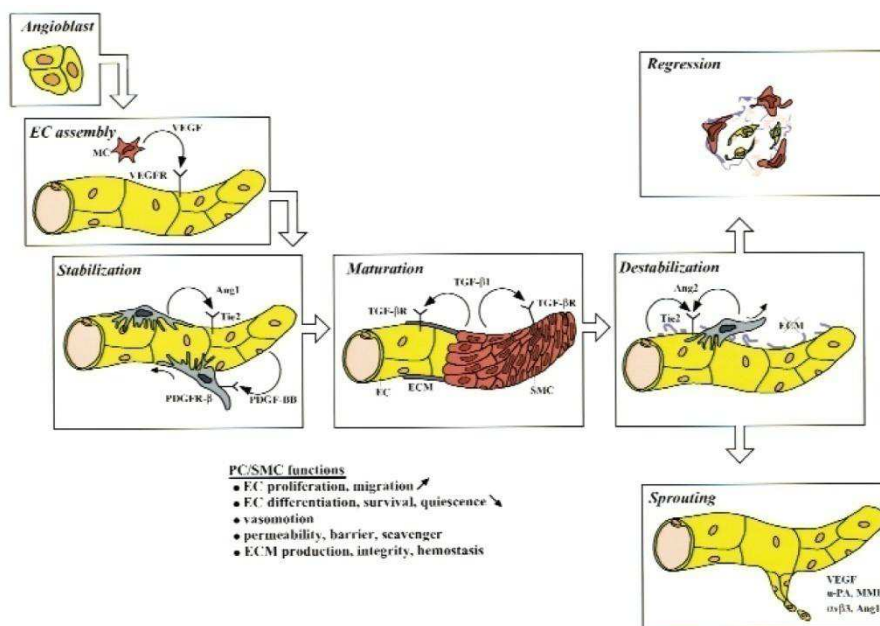
#### **b. Prolifération endothéliale et migration.**

Après cette phase initiale, les cellules endothéliales peuvent se multiplier et migrer vers leur site d'intérêt. Le VEGF, le PLGF (placental growth factor), le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D et leurs récepteurs VEGFR2, VEGFR3 et la neuropilin-1 (un co-récepteur du VEGFR2) sont impliqués dans les différents aspects de cette étape, avec pour chacun des



rôles spécifiques. Le VEGF et son récepteur VEGFR2 sont impliqués dans l'embryogénèse et l'angiogenèse pathologique et sont des cibles thérapeutiques étudiées depuis plusieurs années. En association au VEGF, l'Angiopoïétine 2 a des propriétés pro-angiogéniques. La famille des Platelet derived growth factor (PDGF) ont un effet indirect sur l'angiogenèse en recrutant des cellules mésenchymateuses et inflammatoires.

**Figure 6 :**



## 2. Angiogenèse de la circulation artérielle bronchique

La vascularisation artérielle bronchique possède un pouvoir d'adaptation aux situations pathologiques avec la capacité de se développer au cas de besoin et d'involver lorsque la situation le permet pour retrouver son anatomie initiale [17]. Cette propriété est spécifique de la circulation bronchique par rapport à la circulation artérielle pulmonaire qui dont les capacités de prolifération sont limitées [7].

L'obstruction de la vascularisation pulmonaire est un facteur de prolifération de la vascularisation artérielle bronchique décrit depuis 1847 par Virchow. Les artériographies bronchiques de patients présentant une pathologie thromboembolique chronique révèlent la capacité de la vascularisation bronchique de se développer et de s'étendre aux zones pulmonaires ischémiées. Cette observation a pu être étudiée dans d'autres espèces animales telles que le mouton, le chien, le cochon et le rat [17].

L'hypoxie lorsqu'elle est aiguë peut entraîner une vasodilatation de la vascularisation bronchique, cependant le rôle de l'hypoxie chronique est plus difficile à démontrer. Il semblerait que l'hypoxie chronique entraîne une prolifération de la circulation broncho-pulmonaire.

Plusieurs études démontrent un rôle de l'infection dans la survenue d'une angiogenèse de la circulation systémique bronchique, ceci en observant la densité vasculaire bronchique ou bien en mesurant les taux de VEGF après exposition à un pathogène microbien (*Mycoplasma pneumoniae* chez l'homme, *Mycoplasma pulmonis* et Rhinovirus syncytial chez la souris). Par exemple, Thurston et coll. [18] ont montré une augmentation de la densité vasculaire trachéale chez la souris après exposition au *Mycoplasma pulmonis* et Lee et coll. [19] ont décrit une augmentation de la synthèse de VEGF par des cellules épithéliales respiratoires exposées aux Rhinovirus.

L'expression transgénique inducible de VEGF<sub>165</sub> dans l'épithélium respiratoire de souris conduit au développement rapide (en quelques jours après l'activation du transgène) d'une hypervascularisation péribronchique, soulignant l'importance des communications entre endothélium et épithélium [10].

### 3. Le VEGF et ses récepteurs

#### a. Biologie du VEGF (VEGF-A)

La famille des VEGFs comporte plusieurs facteurs de croissance : VEGF (ou VEGF-A), le VEGF-B, le PlGF, le VEGF-C et le VEGF-D. Les propriétés proangiogéniques de VEGF ont été découvertes en 1989 par Ferrara et al. [20], alors que les descriptions initiales avaient décrit cette molécule comme un facteur de perméabilité vasculaire [21, 22]. VEGF-A est capable à lui seul, d'induire la prolifération, le bourgeonnement, la migration et la formation de tube par les cellules endothéliales [15]. Il joue aussi un rôle dans la survie cellulaire comme facteur anti-apoptotique pour les cellules endothéliales en augmentant leur synthèse de protéines anti-apoptotiques [15]. Enfin il est capable d'induire une vasodilatation en agissant comme un inducteur de la eNOS (endothelial nitric oxide synthase) et favorise donc la production endothéliale de NO [23]. On retrouve des récepteurs de VEGF sur les cellules endothéliales mais également sur d'autres types cellulaires. Les effets de VEGF ne sont pas limités à leur action sur les cellules endothéliales : le VEGF agit sur la mobilisation des cellules hématopoïétiques, le recrutement de monocytes, l'ostéosynthèse par le biais de l'activation des ostéoblastes et la protection neuronale. De plus, le VEGF est un agent chimiotactique pour les cellules inflammatoires, et favorise la dégradation protéolytique de la matrice dans le cadre de l'angiogenèse.

L'hypoxie, par l'activation du hypoxia inducible factor-1 HIF-1 $\alpha$ , augmente la synthèse de l'ARNm du VEGF, de nombreuses cytokines incluant le platelet-derived growth factor, l'epidermal growth factor (EGF), le basic fibroblast growth factor et les transforming growth factors induisent la synthèse de VEGF [15].

Le VEGF provient d'un unique gène. La protéine est un homodimère composé de 2 sous unités identiques de 121, 145, 165, 183, 189 ou 206 acides aminés [24]. Les isoformes

majeures secrétées par le plus grand nombre de types cellulaires sont le VEGF<sub>121</sub>, le VEGF<sub>165</sub> et le VEGF<sub>189</sub>. Le VEGF<sub>121</sub> est la forme la plus soluble et diffuse librement. L'isoforme VEGF<sub>165</sub> serait la plus représentée et la plus active, la majeure partie du VEGF<sub>165</sub> secrété va se lier aux protéoglycanes des membranes cellulaires [24]. L'isoforme VEGF<sub>189</sub> correspond au VPF (Vascular permeability factor), cette isoforme est entièrement piégée par les proteoglycanes membranaires et forme ainsi un réservoir matriciel de VEGF mobilisable en cas de protéolyse matricielle [24].

### **b. Les récepteurs du VEGF : VEGFR1 et VEGFR2**

Le VEGF agit par l'intermédiaire de ses récepteurs par mécanismes paracrines ou autocrines. Il a deux principaux récepteurs, le VEGFR1 (fms-like tyrosine kinase, Flt-1) et le VEGFR2 (KDR/fetal liver Kinase, Flk-1), mais le VEGF se lie également à la neuropilin-1 (Nrp-1) et Nrp-2. Le VEGFR1 est un récepteur transmembranaire avec une activité tyrosine kinase intracellulaire. Il se lie au VEGF, VEGF-B et au PlGF avec une très grande affinité, cependant, sa liaison ne transmet qu'une faible activité mitogénique endothéliale [24]. Lorsqu'il se combine en hétérodimère avec le VEGFR2, cette association est responsable d'une augmentation des activités induites par le VEGF. Il est exprimé par les cellules endothéliales, les ostéoblastes, les monocytes/macrophages, les péricytes, les trophoblastes placentaires, les cellules rénales mésangiales et par certaines cellules hématopoïétiques [24]. Son expression est augmentée, contrairement à celle du VEGFR2, dans le cadre de l'angiogenèse, en présence d'hypoxie. Il existe une forme soluble de VEGFR1 qui ne comporte pas d'activité tyrosine kinase, celle-ci étant composée uniquement de la forme extracellulaire de la protéine transmembranaire. Le VEGFR1 est donc le plus souvent considéré comme un récepteur inactif qui agit en inhibiteur compétitif de la liaison VEGF/VEGFR2 et effectue également un rétrocontrôle négatif des phénomènes d'angiogenèse puisque son expression est augmentée dans ce contexte [24].

Le VEGFR2 se lie au VEGF, VEGF-C et VEGF-D. Son affinité avec le VEGF est inférieure à celle du VEGFR1, le VEGFR2 est pourtant considéré comme le récepteur actif du VEGF dans les cellules endothéliales. Son expression est auto-régulée positivement par ses ligands (VEGF, VEGF-C et VEGF-D). Outre les cellules endothéliales, le VEGFR2 est exprimé par de nombreux types cellulaires tels que les neurones, les ostéoblastes, certaines cellules pancréatiques, les progéniteurs des cellules rétinienne, les mégacaryocytes et les cellules hématopoïétiques. Son activation par ses ligands initie une angiogenèse et augmente la perméabilité vasculaire.

#### **4. Angiogenèse artérielle bronchique dans les pathologies bronchiques chroniques.**

Le poumon est le tissu humain où le VEGF mRNA est le plus exprimé. Cette observation témoigne du fait que le poumon est un organe où il existe un fort potentiel de remodelage vasculaire en fonction des conditions auxquelles celui-ci est exposé. Les cellules pulmonaires exprimant le VEGF sont nombreuses parmi lesquelles on retrouve : les cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires, les cellules mésenchymateuses, les cellules musculaires lisses, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles. L'implication du VEGF dans les pathologies pulmonaires est retrouvée dans les pathologies inflammatoires bronchiques chroniques, mais également dans toutes les pathologies responsables d'hypoxie chronique du fait de l'action directe de l'hypoxie sur la synthèse de VEGF. Nous avons détaillé ci-dessous son implication dans l'asthme, la BPCO et les dilatations des bronches avec le cas particulier de la mucoviscidose.

### a. Asthme

La description d'une angiogenèse bronchique chez les patients asthmatiques existe depuis 1960. Dunnill a décrit la présence d'une hypervascularisation bronchique sur les biopsies bronchiques post-mortem de patients décédés d'asthme aigu grave [25]. Une augmentation de la perméabilité vasculaire des capillaires bronchiques a également été décrite à cette époque [26]. Néanmoins une controverse a duré de nombreuses années sur la réalité d'une angiogenèse plutôt que d'une dilatation vasculaire. Salvato a finalement montré en 2001 qu'il existait une augmentation de la densité vasculaire dans la paroi bronchique chez les patients asthmatiques par comparaison à des sujets normaux [27]. Cette constatation était plus marquée chez les sujets ayant un asthme sévère et il existait des remaniements intenses de toute la paroi vasculaire [27]. L'étude de Feltis et coll. a suggéré que l'angiogenèse bronchique était moins marquée chez des patients traités à fortes doses de corticoïdes inhalés (Fluticasone 2000µg/j) [28].

De nombreux médiateurs sont produits dans le cadre de l'inflammation bronchique de l'asthme et peuvent être considérés comme pro-angiogéniques tels que le TNF-alpha, le beta-FGF, le TGF-beta et l'IL-8 [14]. Le rôle du VEGF dans l'angiogenèse bronchique de l'asthme est suspecté sur la base d'études immuno-histochimiques comme détaillé dans une synthèse récente de Walters et coll. [29]. Ainsi, Hoshino et coll. ont montré que l'importance de l'expression du VEGF (mRNA) est directement corrélée avec l'importance de l'hypervascularisation et de l'hyperréactivité bronchique, et inversement corrélée au VEMS [30]. Ces auteurs ont également étudié l'expression des récepteurs de VEGF, VEGFR1 et VEGFR2, qui était augmentée chez les patients asthmatiques par rapport aux contrôles. Dans cette étude, les cellules qui exprimaient le VEGF étaient les cellules endothéliales, les macrophages et les polynucléaires éosinophiles mais pas les cellules épithéliales (25).

## **b. BPCO**

La BPCO est une pathologie comportant une atteinte bronchique et bronchiolaire et une atteinte alvéolaire (emphysème) caractérisée par la destruction des septas alvéolaires. L'angiogenèse dans la BPCO est un domaine très peu étudié, même si les premières études datent de 1959 où Liebow décrivait des septas avasculaires dans l'emphysème. Les principales études portent sur la vascularisation alvéolaire mais pas sur la vascularisation bronchique et bronchiolaire.

Dans l'emphysème, il existe un amincissement de la barrière alvéolaire qui devient quasiment avasculaire et l'expression alvéolaire du VEGF y est diminuée [31]. Parallèlement, il existe une corrélation positive du VEMS et de l'expression de VEGF. Kasahara et coll. ont évoqué une théorie expliquant la disparition des vaisseaux septaux dans l'emphysème, la fumée de cigarette aurait un effet de diminution de la synthèse de VEGF entraînant une apoptose prématurée des cellules endothéliales septales [31, 32]. Leur étude consistait à administrer un inhibiteur des récepteurs de VEGF à des rats, ainsi ils ont pu induire de l'emphysème chez leurs animaux [32]. Selon ces auteurs, l'emphysème serait provoqué non seulement par un déséquilibre protéase-antiprotéase qui est classiquement décrit, mais aussi par un déficit en facteur de croissance endothéliale. Le VEGF et ses récepteurs sont présents en abondance dans les poumons normaux et sont nécessaires à la survie des cellules endothéliales en induisant une augmentation de synthèse de protéines anti-apoptotiques, la diminution des taux de VEGF induirait une mort cellulaire prématurée et une destruction parenchymateuse responsable de l'apparition de l'emphysème [29].

Les études portant sur la vascularisation bronchique et bronchiolaire et la synthèse de VEGF chez les patients BPCO sont rares. Au niveau bronchique on observe une augmentation de la vascularisation péribronchique chez les sujets BPCO par rapport à des témoins non-

fumeurs [33]. Cette hypervascularisation est moins marquée chez les BPCO que chez les asthmatiques [33]. L'étude de Kranenburg montre une augmentation de l'expression de VEGF et de ses récepteurs dans l'épithélium bronchique et bronchiolaire des patients atteints de BPCO par rapport à des fumeurs sans BPCO [34]. Ces données suggèrent un rôle pour le VEGF produit par l'épithélium bronchique et bronchiolaire dans l'hypervascularisation bronchique de la BPCO.

### **c. Dilatations des bronches et mucoviscidose**

La littérature portant sur les dilatations des bronches et l'angiogenèse bronchique ou l'expression pulmonaire de VEGF est très pauvre voir absente. Chez les patients atteints de mucoviscidose, deux études décrivent une augmentation des concentrations sériques de VEGF [35, 36]. Dans l'étude de Krenn et coll., les auteurs ont étudié l'expression pulmonaire de VEGF et ses récepteurs, l'importance de l'œdème interstitiel et la densité microvasculaire sur des prélèvements pulmonaires de patients mucoviscidosiques et BPCO ayant bénéficié d'une transplantation pulmonaire et de patients « contrôles » : patients non-fumeurs, sans antécédent, hospitalisés pour symphyse pleurale dans le cadre d'un pneumothorax spontané idiopathique [35]. Chez ces mêmes patients, l'équipe de Krenn a également mesuré les taux sériques de VEGF [35]. Les résultats ont montré que les patients mucoviscidosiques avaient une expression pulmonaire augmentée de VEGF et de ses récepteurs (dans les homogénats de poumons testé par Western Blot), une augmentation de l'importance de l'œdème interstitiel et une augmentation des taux sériques de VEGF sans qu'il n'y ait de modification de la densité microvasculaire [35]. Ils concluent que l'expression et la sécrétion de VEGF est augmentée chez les patients mucoviscidosiques, ceci entraînant une augmentation de la perméabilité vasculaire [35]. Leur méthode d'évaluation de la densité microvasculaire n'a pas permis de retrouver l'existence d'une angiogenèse [35]. L'étude réalisée par Mc Colley et coll. a



retrouvé une augmentation de VEGF sérique chez les patients atteints de mucoviscidose et suggéré un lien entre les taux sériques de VEGF et l'infection bronchique [36] : les auteurs ont mesuré les taux sériques de VEGF chez des patients mucoviscidosiques et les ont comparés à ceux de patients présentant une autre pathologie pulmonaire avec une composante inflammatoire bronchique : asthme et dysplasie bronchopulmonaire, fistule oesophago-trachéale compliquée de bronchite chronique, pleurésie infectieuse, sclérodermie et dilatation des bronches. Leurs résultats ont montré qu'il existait une élévation des taux de VEGF chez les patients de leur étude par rapport aux taux habituellement retrouvés dans la littérature chez les sujets exempts de pathologie. Dans la deuxième partie de leur étude ils se sont intéressés uniquement aux patients mucoviscidosiques et ont retrouvé outre une corrélation négative entre les taux de VEGF et le VEMS de leurs patients mais également et surtout une franche diminution des taux de VEGF sériques après que les patients aient eu une cure antibiotique. Ceci suggérant un lien entre VEGF et inflammation bronchique et/ou infection bronchique. Cette étude a cependant été critiquée car le VEGF sérique pourrait provenir essentiellement des plaquettes et son élévation dans les exacerbations de mucoviscidose pourrait être essentiellement liée au syndrome inflammatoire qui s'accompagne d'une augmentation du nombre de plaquettes (thrombocytose) [37].

Verhaeghe et coll. ont étudié la synthèse de facteurs pro-angiogéniques (VEGF-A, VEGF-C et PLGF) par des cellules trachéales humaines immortalisées porteuses (CFT-2) ou non (NT-1) de la mutation  $\Delta F508$  [38]. En réalisant des co-cultures avec des cellules endothéliales fœtales provenant de la veine ombilicale (HUVEC), ils ont également étudié l'effet des cellules mutées  $\Delta F508$  sur la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Les résultats ont montré que les cellules mutées  $\Delta F508$  avaient une synthèse augmentée de VEGF-A, VEGF-C et de PLGF par rapport aux cellules non mutées. Parallèlement les cellules mutées  $\Delta F508$ , étaient responsables d'une prolifération et d'une migration des cellules

HUVECs [38]. Les auteurs ont suggéré que les cellules mutées  $\Delta F508$  avaient une capacité intrinsèque de promouvoir une angiogenèse via l'expression de facteurs proangiogéniques tels que le VEGF et le PLGF, indépendamment de toute inflammation ou infection [38]. Il faut cependant remarquer que ces études se sont limitées à un modèle in vitro et que le rationnel pour évaluer l'expression de facteurs proangiogéniques par l'épithélium respiratoire mucoviscidose était faible du fait de l'absence d'étude humaine sur le sujet.

#### **IV. RECEPTEUR DE L'ÉPIDERMAL GROWTH FACTOR (EGFR) ET IMMUNITÉ INNÉE ANTIBACTÉRIENNE**

##### **1. Introduction**

L'air inhalé est contaminé par différents pathogènes tels que des microorganismes (virus, bactéries), des allergènes ou des irritants (pollution atmosphérique, fumée de cigarette). L'épithélium des voies aériennes respiratoires de conduction constitue la première ligne de défense contre ces agents inhalés. Cette première ligne de défense fait partie de ce que l'on appelle les mécanismes de défense immunitaire innée. On l'appelle innée car elle ne nécessite pas d'exposition antérieure au pathogène : elle possède d'emblée la capacité d'intercepter par le biais de récepteurs spécifiques, les signaux et la présence de microorganismes bien définis. Il s'agit bien de défense « immunitaire » car son objectif est l'éradication des pathogènes et autres agents inhalés et le maintien de l'intégrité de l'hôte.

La recherche sur la fonction de défense immunitaire de l'épithélium respiratoire est en pleine expansion. Elle comprend des études portant sur les mécanismes permettant à l'épithélium respiratoire de détecter les microorganismes et leurs facteurs de virulence par exemple, mais également sur les molécules produites par l'épithélium en réponse à l'exposition à ces microorganismes. Dans les dernières années, une famille de récepteurs, les « pattern-

recognition receptors » (PRRs) a été individualisée. Ces récepteurs reconnaissent spécifiquement certains motifs présents chez les pathogènes. Les Toll-like receptors (TLRs) sont les plus connus de PRR et sont exprimés en particulier par l'épithélium respiratoire. La reconnaissance d'un élément pathogène par un récepteur appartenant à la famille des PRRs provoque la mise en jeu de multiples mécanismes de défense visant à l'éradication du pathogène et au maintien de l'intégrité de l'hôte. Ainsi, les peptides antimicrobiens (par exemple, les défensines) sont des molécules produites et sécrétées par l'épithélium respiratoire qui inhibent la croissance des agents bactériens. Les mucines sécrétées (principalement MUC5AC et MUC5B) ont un pouvoir d'adhésion des agents pathogènes [39] et participent à leur clairance par l'intermédiaire du transport muco-ciliaire et la toux. L'extravasation de leucocytes dans les voies aériennes, favorisée par la synthèse de chimiokines par l'épithélium respiratoire, et leur capacité de phagocytose sur les particules inhalées sont un important mécanisme de défense. L'épithélium respiratoire a également la capacité d'organiser sa propre réparation lors de lésions causées par une agression extérieure. Normalement, une réponse locale à une agression par un pathogène est adaptée et n'induit pas d'inflammation, les structures ne sont pas modifiées et l'intégrité de l'hôte est maintenue sans qu'il n'y ait de symptôme. Une hypothèse est qu'il arrive que les mécanismes de défense innée induisent une réponse de l'hôte inappropriée avec une réponse inadaptée, exagérée responsable du développement d'anomalies structurales (remodelage) des voies aériennes.

Au cours des années 2000, le rôle du récepteur de l'EGF dans la défense innée de l'épithélium respiratoire a été mis en évidence [40]. La cascade cellulaire initiée par l'activation de l'EGFR induit des réponses spécifiques de défense par l'épithélium respiratoire, principalement, la sécrétion de mucines, le recrutement de neutrophiles par la sécrétion d'IL-8 et la réparation épithéliale. L'EGFR appartient à la famille des récepteurs ErbB qui comprend 4 membres : l'EGFR ou ErbB1/Human epidermal growth factor (HER)1,

ErbB2/Neu/HER2, ErbB3/HER3 et ErbB4/HER4. Il s'agit pour tous de récepteurs transmembranaires comprenant un site de liaison dans le domaine extracellulaire, une seule région transmembranaire et un site intracellulaire cytoplasmique contenant une protéine kinase. Une fois liés à leurs ligands, les récepteurs ErbB forment des dimères (homo ou hétérodimères) conduisant à l'activation (la phosphorylation) du domaine intracellulaire et donc de sa protéine kinase. Dans l'épithélium respiratoire humain il existe une expression de l'EGFR, HER2 et HER3 alors qu'HER4 n'est pas représenté. On peut donc observer la formation d'homodimères EGFR et d'hétérodimères EGFR-HER2 et EGFR-HER3 en présence de leur ligands. La réponse cellulaire suite à la formation d'un homodimère ou d'un hétérodimère EGFR-HER2 ou HER3 semble être variable. Il y a peu de données dans la littérature sur ce point. Nous nous sommes donc concentrés sur le rôle propre de l'activation de l'EGFR dans la mise en place d'une réponse immunitaire innée par l'épithélium respiratoire.

## **2. Implication de l'EGFR dans la défense épithéliale innée.**

L'EGFR est connu dans la littérature pour participer à une augmentation de la sécrétion des mucines par l'épithélium respiratoire. Les mucines sont des glycoprotéines de grande taille qui représente la composante principale du gel de surface du mucus. L'hypersécrétion de mucus est impliquée dans la pathogénie de nombreuses pathologies respiratoires chroniques comme l'asthme, la BPCO et les dilatations des bronches dont la mucoviscidose. Dans ces pathologies, outre l'hypersécrétion de mucus il existe également un recrutement des neutrophiles qui sont recrutés dans la lumière bronchique et qui se retrouvent à l'intérieur des bouchons de mucus obstruant les voies aériennes. L'IL-8 est une interleukine connue pour son rôle spécifique dans le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles, elle

est exprimée et sécrétée par de nombreux types cellulaires, dont les cellules épithéliales respiratoires. L'EGFR participe à l'augmentation de la sécrétion de l'IL-8 par les cellules épithéliales respiratoires en réponse à la stimulation par le *Pseudomonas aeruginosa* et son facteur de virulence LPS ainsi que par le *Staphylococcus aureus*.

Enfin, l'EGFR a également été impliqué dans les mécanismes de réparation épithéliale après blessure [41]. En présence d'une stimulation de l'EGFR, l'épithélium se répare plus vite que celui non stimulé et lorsque l'épithélium blessé était cultivé en présence de faibles concentrations (non toxiques) de LPS, celui-ci se réparait également plus vite, et ce, via l'activation de l'EGFR. Cette observation permet d'inclure l'EGFR dans des mécanismes de défense innée en réponse à une agression par des pathogènes.

L'EGFR est donc un récepteur impliqué dans divers aspects de la défense innée de l'épithélium respiratoire qui, en réponse à une agression va augmenter sa protection de surface (augmentation de la sécrétion de mucines), augmenter la présence de cellules inflammatoires (attraction des polynucléaires) et augmenter la rapidité de la réparation épithéliale en cas de lésion.

### **3. Cascade cellulaire de surface impliquant l'EGFR en réponse à une agression**

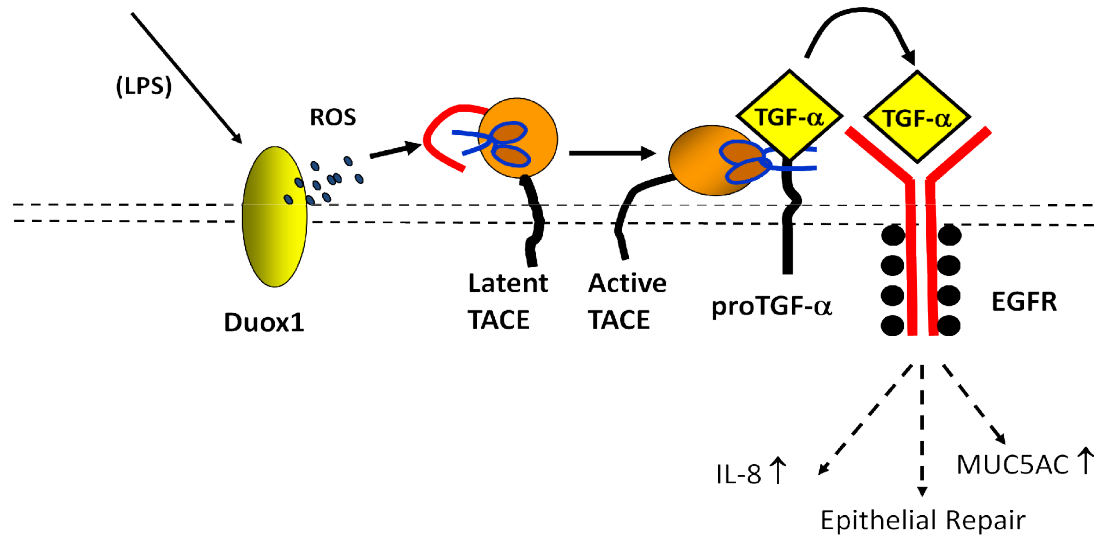
Il existe 6 ligands de l'EGFR : L'Epidermal Growth Factor (EGF), le Transforming Growth Factor alpha (TGF- $\alpha$ ), l'heparin binding (HB)-EGF, l'amphiréguline, la betacelluline et l'épiréguline. Ces différents ligands sont produits par de nombreux types cellulaires et notamment par des cellules inflammatoires telles que les polynucléaires éosinophiles, les polynucléaires neutrophiles, les mastocytes et les macrophages. Les cellules épithéliales respiratoires produisent des pro-ligands inactifs qui nécessitent un clivage protéolytique pour

former les ligands actifs, c'est à dire ayant la propriété d'activer l'EGFR à la surface de la cellule épithéliale. La majorité des stimuli connus pour activer l'EGFR ne l'activent pas directement mais par une action sur les pro-ligands. Le lipopolysaccharide (LPS) est un produit sécrété par les bacilles à Gram négatifs. Le LPS a été initialement identifié comme inducteur d'une hypersécrétion de mucus sur des cultures épithéliales respiratoires par un mécanisme inconnu. Ultérieurement, les auteurs ont montré que l'exposition de cellules épithéliales respiratoires en culture (NCI-H292) à du surnageant de culture bactérienne de *Pseudomonas aeruginosa* [42] ou à l'élastase du neutrophile [43] induisaient une hypersécrétion de mucines via l'activation de l'EGFR. Dans l'étude utilisant comme stimulation l'élastase du neutrophile il a même été démontré que l'activation de l'EGFR faisait suite à une cascade moléculaire extracellulaire impliquant le clivage du pro-TGF-alpha transmembranaire en TGF-alpha soluble et actif capable de se lier à l'EGFR exprimé à la membrane cellulaire. La métalloprotéase impliquée dans le clivage des ligands n'a pas été identifiée.

Les cellules épithéliales expriment la métalloprotéase TACE (Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme) membre de la famille des disintegrines et les métalloprotéases appartenant à la famille ADAM qui sont un groupe de métalloprotéases transmembranaires dépendantes du zinc.

Figure 7 :

PA secreted products



#### 4. Récepteur de l'EGF et synthèse de VEGF

Ces dernières années, l'intérêt pour les récepteurs à activité tyrosine kinase a fait l'objet de nombreux travaux dans le domaine de la cancérologie. Le récepteur de l'EGF a été largement impliqué dans les mécanismes de cancérogénèse humaine (en particulier, dans les cancers de la sphère ORL, du poumon et du colon). Dans le même temps, les travaux de Folkman ont attiré l'attention sur l'importance de l'angiogenèse en pathologie tumorale [44] et la découverte du VEGF [22] et de son rôle central dans l'angiogenèse tumorale a été mise en évidence [15]. La mise au point d'inhibiteurs de tyrosine kinase sélectif du récepteur de l'EGF [45] a rapidement révélé les effets antitumoraux de ces thérapeutiques. Plusieurs équipes ont mis en évidence le rôle anti-angiogénique des inhibiteurs de la tyrosine kinase du récepteur de l'EGF. Cet effet pourrait être lié à une inhibition de la synthèse de VEGF par les cellules tumorales tels que montré sur des cellules épithéliales tumorales [46-49], ou par un effet direct sur les cellules endothéliales qui expriment le récepteur de l'EGF [50]. A notre

connaissance, l'effet des antagonistes du récepteur de l'EGF sur l'angiogenèse non tumorale n'a pas été étudié.



# **ETUDES**

# I. L'INFECTION BRONCHIQUE A *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* INDUIT LA SYNTHÈSE DE VEGF PAR L'ÉPITHÉLIUM RESPIRATOIRE *IN VITRO* ET *IN VIVO* CHEZ LA SOURIS. RELATION AVEC L'ANGIOGENÈSE BRONCHIQUE.

## 1. Introduction

Les dilatations des bronches est définie une augmentation permanente et irréversible du diamètre bronchique. La survenue d'infections bactériennes bronchiques récurrentes, pouvant éventuellement évoluer vers une infection bronchique chronique est caractéristique des dilatations des bronches. Le *Pseudomonas aeruginosa* est un des pathogènes le plus fréquemment isolé dans les bronches des patients atteints de dilatations des bronches. Les saignements endobronchiques (ou hémoptysies) sont des complications fréquentes et potentiellement létales des dilatations des bronches. Les hémoptysies proviennent habituellement de saignements d'origine artérielle bronchique, qui contrairement à la vascularisation pulmonaire a un potentiel de prolifération. Les dilatations des bronches sont parmi les pathologies la plus fréquemment associée à une prolifération vasculaire bronchique en rapport avec une angiogenèse bronchique. Même si la survenue d'une hémoptysie massive reste un phénomène rare dans l'évolution des dilatations des bronches, la survenue de saignements minimes à modérés marqués par la présence de sang dans les expectorations est une observation fréquente et souvent en rapport avec une exacerbation infectieuse bronchique. Cependant, les mécanismes conduisant à une angiogenèse bronchique dans le cadre des dilatations des bronches sont inconnus.

Le VEGF-A est un facteur majeur de l'angiogenèse normale et pathologique. Il provoque une prolifération des cellules endothéliale artérielles et veineuses et régule la

perméabilité capillaire en induisant un fenêtrage des cellules endothéliales capillaires. Le VEGF-A est synthétisé par de nombreuses cellules (résidentes et recrutées) dans les voies aériennes dont les cellules épithéliales. Baluk et coll. ont montré que l'expression transgénique de VEGF-A dans l'épithélium bronchique de souris induit une angiogenèse rapide de la circulation bronchique systémique avec un doublement de la densité artérielle trachéale en 7 jours [10]. De nombreuses cytokines telles que l'interleukine-1 ou le TNF- $\alpha$  augmentent l'expression épithéliale de VEGF-A ceci suggérant un rôle possible de l'infection et de l'inflammation dans l'induction de la synthèse de VEGF-A et de l'angiogenèse bronchique.

Le but de notre étude était d'étudier le rôle de l'infection bronchique par *Pseudomonas aeruginosa* dans l'angiogenèse de la circulation bronchique. Nous avons étudié initialement la synthèse de VEGF-A *in vitro* par des cellules épithéliales respiratoires exposées à *Pseudomonas aeruginosa*. Dans un deuxième temps, nous avons développé un modèle murin d'infection bronchique prolongée par l'instillation intra-trachéale de billes d'agarose contenant du *Pseudomonas aeruginosa* de la souche PAO1. Ce modèle nous a permis d'étudier non seulement la synthèse de VEGF-A mais aussi la vascularisation péribronchique au cours d'une infection bactérienne bronchique prolongée. Au cours de la dernière décennie, le récepteur de l'EGF est apparu comme un acteur important de la défense immunitaire innée antibactérienne [40]. Les études menées dans le domaine de la cancérologie ont par ailleurs révélé que l'activation du récepteur de l'EGF a des effets pro-angiogéniques au moins en partie liés à son rôle de régulation de la synthèse de VEGF-A. De ce fait, nous avons souhaité étudier l'effet d'inhibiteurs du récepteur de l'EGF sur la synthèse de VEGF-A et l'angiogenèse bronchique induites par l'infection bactérienne.

## **2. Modèle animal d'infection bactérienne bronchique prolongée.**

### **a. Préambule**

Notre objectif était de disposer d'un modèle animal permettant d'étudier les effets de l'infection bactérienne sur l'angiogenèse bronchique. Chez la souris, les modèles d'infection pulmonaire par *Pseudomonas aeruginosa* portent généralement sur des durées courtes (24 heures) et sont utiles à la compréhension des interactions hôte-pathogène dans le cadre d'infections aiguës (pneumonies). Dans ces modèles, la souris meurt en général dans les premières 24 heures si la quantité de bactérie instillée est élevée mais survit avec une éradication bactérienne complète et une résolution de l'inflammation si la quantité bactérie instillée est plus faible. Pour notre étude, nous souhaitons obtenir une infection se prolongeant au moins sept jours (la durée minimale nécessaire à l'angiogenèse trachéale induite par le VEGF-A chez la souris [10]) pour tester l'hypothèse que l'infection bactérienne provoque une angiogenèse péribronchique. Nous nous sommes donc tournés vers les modèles utilisant des bactéries placées dans des billes d'agarose qui permettent l'obtention d'une infection bactérienne plus prolongée [51]. Par ailleurs, l'objectif était d'obtenir une infection à point de départ bronchique, pour modéliser au mieux la situation retrouvée dans les dilatations des bronches humaines. Les modèles publiés utilisent habituellement des billes d'agarose de petit calibre qui provoquent une infection essentiellement alvéolaire. Il nous a donc été nécessaire d'adapter les modèles existant pour augmenter la taille des billes afin qu'elles se bloquent dans les bronches et que les bactéries soient maintenues en contact rapproché avec l'épithélium bronchique. Les étapes du développement de ce modèle original sont développées ci-après.

## **b. Protocoles**

### Préparation des billes d'agarose

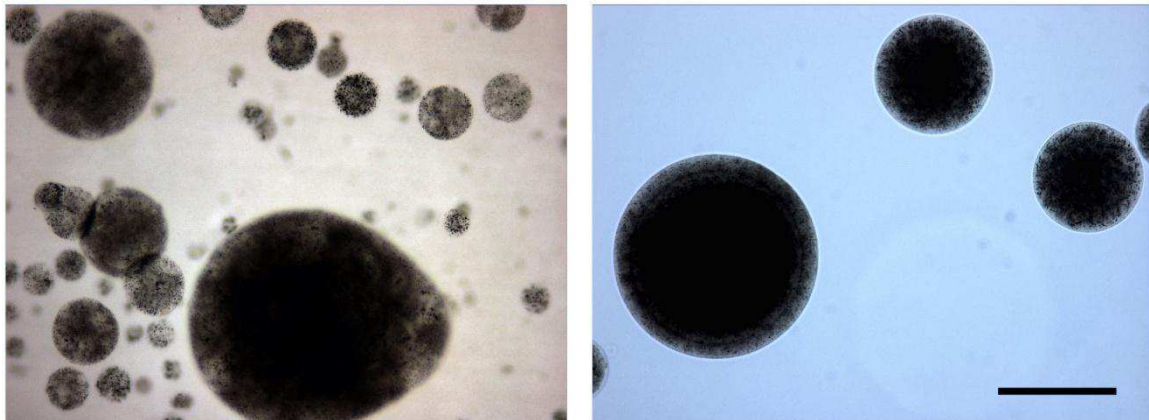
La préparation des billes agarose s'est inspirée d'une technique décrite dans la littérature [52-54]. Notre technique de fabrication a ensuite été adaptée à nos besoins quant à la taille des billes et à la concentration des billes dans la solution d'instillation.

Pour préparer les billes contenant du *Pseudomonas aeruginosa*, nous avons chauffé 150 ml d'huile minérale (Sigma) dans un Erlenmeyer au bain marie jusqu'à une température à 50°C. Dans le même temps, l'agarose (Type XIII, Sigma) a été dissoute au bain marie à 100°C : 0,3g d'agarose dans 15 mL de PBS ; cette solution a été ensuite refroidie à 50°C. Lorsque les deux solutions étaient à la même température, nous avons mélangé 8,5 mL de la solution d'agarose avec l'huile minérale auxquels on a ajouté 1 mL de *Pseudomonas aeruginosa* de la souche PAO1 en suspension dans son milieu de culture ( $10^8$ - $10^9$  CFU/mL). Pour la fabrication des billes d'agarose stériles (Contrôle) nous avons mélangé 9,5 mL d'agarose dissout avec l'huile minérale. Tous les instruments en contact avec la solution ont été préalablement stérilisés. Le caractère stérile des billes a été vérifié par la mise en culture d'échantillons de billes sur des milieux de croissance bactérienne. Les billes infectées par le *Pseudomonas aeruginosa* O1 ont également été mises en culture de façon à comptabiliser la quantité précise de bactéries instillées aux souris (voir plus bas). Pour les deux préparations nous avons rajouté 0,5 mL d'encre de Chine pure afin de pouvoir visualiser facilement les billes sur les coupes histologiques au microscope. Les mélanges ainsi obtenus étaient ensuite maintenus à 50°C et mélangés à l'aide d'un mélangeur (modèle, IKA RW 16 Basic Labo Technic) muni d'une hélice en plastique pendant 6 minutes à la vitesse 4. La solution était ensuite rapidement refroidie à 4°C en la maintenant dans de la glace tout en continuant de mélanger à la même vitesse pendant 20 minutes. La taille finale des billes dépendait de la vitesse de mélange et de la rapidité de refroidissement du mélange. Notre but était d'obtenir

des billes d'une taille supérieure à 300 microns de diamètre de façon qu'elles se bloquent dans les bronches des souris et non dans les alvéoles. La vitesse idéale de rotation a été établie progressivement en faisant varier ces deux paramètres et en évaluant leurs effets sur la taille des billes visualisées sur une lame au microscope optique. Les billes d'agarose mélangées à l'huile minérale ont ensuite été rincées en remplaçant progressivement l'huile minérale par du PBS. Pour se faire, la solution a été centrifugée à 4°C pendant 10 minutes à 4000 rpm, le surnageant aspiré et remplacé par une solution de Sodium déoxycholate à 0,5% (1,5 g de Sodium déoxycholate dans 300 ml de PBS). Les billes ont été re-suspendues puis à nouveau centrifugées 20 minutes à 2500 rpm à 4°C. Le surnageant a de nouveau été aspiré et les billes ont été re-suspendues dans une solution de Sodium déoxycholate à 0,25% (0,75g de Sodium déoxycholate dans 300 mL de PBS) et à nouveau centrifugées comme précédemment. La dernière étape a été répétée deux fois avec du PBS.

Pour obtenir des billes d'un calibre homogène, les solutions de billes ont été tamisées au travers de deux filtres avec des pores de 400 puis 300 microns. Les billes ayant une taille comprises entre 300 et 400 microns ont été conservées. Malgré toutes ces précautions, certaines billes retrouvées dans nos souris étaient plus petites que la taille désirée en raison du fait qu'il se forme des agrégats lors de leur préparation. Au final, les billes étaient diluées de façon à obtenir une solution à 20%. En effet, afin d'obtenir un résultat d'instillation satisfaisant, c'est à dire avec peu ou pas de mortalité immédiate et un nombre de billes par poumon de souris compris entre 10 et 30, différentes concentrations ont été testées et c'est au terme de plusieurs expérimentations que la concentration de 20% nous a permis d'obtenir un résultat optimal. Les billes étaient préparées le matin de l'instillation et conservées à 4°C jusqu'au moment de l'expérience.

**Figure 8: Microphotographies de billes d'agarose.**



**Légende :** A gauche les billes sont photographiées avant tamisage, à droite après tamisage à travers des filtres de 300 et 400 microns. La barre en bas à droite correspond à 300 microns (grossissement initial 50X). La coloration noire est due à l'encre de Chine. Le tamisage a permis d'obtenir des billes de taille relativement uniforme en éliminant les billes de très grosse et de très petite taille.

#### Choix des souris

Notre modèle a été développé sur des souris de fonds génétique C57BL/6, âgées de 4 à 8 semaines avec un poids variant de 18 à 20g. Cette lignée de souris a été choisie en raison des données de la littérature témoignant de différences entre les lignées de souris dans tant sur l'effet de stimuli sur la vascularisation pulmonaire [18] que sur la propension à éradiquer *Pseudomonas aeruginosa* dans les voies aériennes [55]. Les souris C57BL/6 présentaient une augmentation du nombre de vaisseaux péri-trachéaux en réponse à une infection à *Mycoplasma pulmonis* alors que les souris CH3 présentaient simplement une augmentation du diamètre des vaisseaux pré-existants [18]. Initialement, nous avons testé deux lignées de souris, les Balb/C et les C57BL/6. Ces deux lignées ont été infectées avec des billes contenant du *Pseudomonas aeruginosa* et nous avons effectué une coloration par le bleu d'Alcian-PAS (pour identifier les cellules caliciformes contenant des mucines) sur les tissus pulmonaires inclus en paraffine. Les souris C57BL/6 présentaient des modifications histologiques claires

avec notamment une hyperplasie épithéliale bronchique, un recrutement de cellules inflammatoires intra-luminales autour des billes (principalement des polynucléaires neutrophiles) et dans les alvéoles mais également une augmentation de l'expression épithéliale bronchique et de sécrétion intra-luminale de mucines. Les souris Balb/C avaient un profil inflammatoire beaucoup plus discret et une moindre expression de mucines. Nous avons donc choisi de développer notre modèle sur des souris C57BL/6.

### Instillation des souris

Les souris ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale au moyen d'une aiguille de 20G en injectant un mélange de Kétamine (15 mg/mL) et Xylazine (2 mg/mL) à la dose de 0,1 mL/10g. La souris anesthésiée était placée sur le dos, la tête luxée par un contre poids fixé au niveau des incisives supérieures. Une canule de gavage à pointe fine était introduite dans la trachée de façon non traumatique et 150 microlitres de la solution de billes à 20% étaient injectés. La souris était observée jusqu'à obtention de signes cliniques de détresse respiratoire : dyspnée, augmentation de la fréquence respiratoire, tirage, et décoloration des téguments. En l'absence de ces symptômes, l'instillation était recommencée. La souris était ensuite placée dans une chambre avec un air enrichi en oxygène et surveillée jusqu'au premiers signes de réveil (mouvements spontanés).

### Traitement des souris

Dans certaines expériences, les souris infectées ont été traitées avec un inhibiteur sélectif de la tyrosine kinase du récepteur de l'EGF, la tyrphostine AG1478 (Sigma). Les souris ont été pré-traitées la veille de l'instillation et quotidiennement jusqu'au jour du sacrifice par une injection intra-péritonéale de 200 microL de produit. Les souris ont été divisées en 2 groupes selon le produit injecté :



A : DMSO 50% dans du sérum physiologique (soit par souris : 100 microL de sérum physiologique et 100 microL de DMSO pur)

B : DMSO 50% dans du sérum physiologique + 12,5 mg/kg d'AG1478 (soit par souris : 200 microL de A + 0,25 mg d'AG1478). Ces doses d'inhibiteur ont été choisies en référence à un article précédemment publié [56].

### Sacrifice des souris

Pour débiter, nous avons décidé d'évaluer l'évolution de notre modèle dans le temps afin de déterminer le meilleur moment pour observer l'impact de l'infection bronchique persistante sur l'angiogenèse bronchique et la synthèse épithéliale de VEGF. Pour ce faire, nous avons fait une première expérience d'instillation d'une série de souris avec billes infectées en sacrifiant les animaux à J1, J4, J7, J14, J21, J28, J42 et J64. Il y avait 2 à 6 animaux par groupe. Les résultats de cette expérience nous ont permis de confirmer les données de la littérature, en effet Bragonzi et coll. qui travaillent sur un modèle proche du notre, considèrent que l'infection est chronique dès lors que la souris survit à J7 puisque les lésions inflammatoires ne se modifient pas selon eux entre J7 et J40 [57]. Nous avons fait la même constatation sur nos animaux à la différence près que le nombre de cellules inflammatoires recrutées dans les voies aérienne paraissait plus important à J7 qu'à J14. Baluk et coll. ayant décrit l'apparition de néovaisseaux péritrachéaux après l'induction d'une hyperexpression de VEGF dans l'épithélium respiratoire chez la souris en 7 jours [10], nous avons finalement choisi de sacrifier nos animaux à J7.

Avec ces conditions expérimentales, la mortalité prématurée des souris était très faible (10 décès précoces sur plus de 300 animaux soit 3,3%). La mortalité immédiate était de loin la principale cause de décès par obstruction bronchique massive induisant une insuffisance

respiratoire aigue, comme décrit dans la littérature [51]. Seules trois souris sont mortes entre J1 et J4 après l'instillation, probablement de pneumonie.

Les souris ont été sacrifiées à J1 et J7 après l'instillation intratrachéale selon un protocole établi. Elles ont été anesthésiées comme lors de l'instillation. Lorsqu'un lavage bronchoalvéolaire était prévu, la souris était installée comme pour l'instillation, la trachée mise à nu et sectionnée et 2 ml de sérum physiologique étaient introduits puis ré-aspirés et conservés pour étude. Ensuite, et pour toutes les souris, on réalisait une thoracotomie de façon à accéder au ventricule droit. Avec une aiguille intradermique nous avons aspiré le sang à travers le ventricule droit. Lorsque les poumons étaient préparés pour l'étude histologique, on injectait 1 mL de paraformaldehyde (PFA) à 4% à travers le ventricule droit. Enfin, les poumons étaient retirés puis rincés dans du PBS avant de les placer dans de PFA 4% à 4°C. Les poumons étaient ensuite déshydratés après des bains successifs de 10 minutes dans du PBS puis de l'éthanol à 30%, 50% et 70%. Les poumons étaient ensuite conservés dans de l'éthanol à 70% avant l'inclusion en paraffine.

Lorsque les poumons étaient préparés pour analyse bactériologique, ils étaient retirés puis homogénéisés dans 500 microL de sérum physiologique. L'homogénat était mis en culture pour le décompte bactérien effectué 24h après.

Lorsque les poumons étaient préparés pour l'analyse Western Blot, les poumons étaient retirés, pesés, puis incubés 20 minutes dans du tampon de lyse (CellLytic, Sigma) contenant des anti-protéases (1 comprimé pour 50 mL de tampon de lyse, Complete Mini Proteaseinhibitor cocktail tablets, Roche) avant d'être homogénéisés. L'homogénat était ensuite centrifugé 15 mn à 4°C à 2500 rpm et les surnageants récupérés avant d'être conservés à -80°C avant analyse.

### c. Un modèle d'infection bronchique prolongée

#### Résultats bactériologiques

Notre objectif était de limiter la quantité de l'inoculum bactérien pour ne pas provoquer une surmortalité précoce des souris. Il fallait cependant avoir un inoculum suffisant pour provoquer une infection chronique. Après une analyse de la littérature, il est apparu que les modèles de pneumonie utilisaient généralement un inoculum bactérien de l'ordre de  $10^7$  à  $10^9$  CFU/animal, suggérant qu'un inoculum plus faible ( $10^6$  CFU/animal) était plus adapté à la création d'un modèle d'infection chronique.

Nos cultures de *Pseudomonas aeruginosa* en milieu liquide contenaient  $1,01.10^{10}$  +/-  $2,73.10^9$  CFU/mL. Les solutions de billes d'agarose contenant du *Pseudomonas* ont été mises en culture et comprenaient  $3,19.10^7$  +/-  $2,62.10^7$  CFU/mL, correspondant à une instillation de  $4,79.10^6$  +/-  $3,94.10^6$  CFU par souris. Avec ces conditions expérimentales, seules 3 souris décédées spontanément entre J1 et J4, probablement pneumonie aiguë. Lorsque les souris étaient sacrifiées (entre J1 et J7 après l'instillation, certains poumons ont été homogénéisés et mis en culture sur des milieux bactériens pour confirmer la présence d'une infection bronchique prolongée. Les moyennes des résultats obtenus sont décrites dans le tableau ci-dessous :

Temps du sacrifice	J0 (n>50)	J1 (n=6)	J4 (n=6)	J7 (n=28)
CFU/souris	$4,79.10^6$ +/- $3,94.10^6$	$6,17.10^4$ +/- $5,71.10^4$	$1,3.10^4$ +/- $1,2.10^4$	$8,36.10^2$ +/- $3,79.10^2$

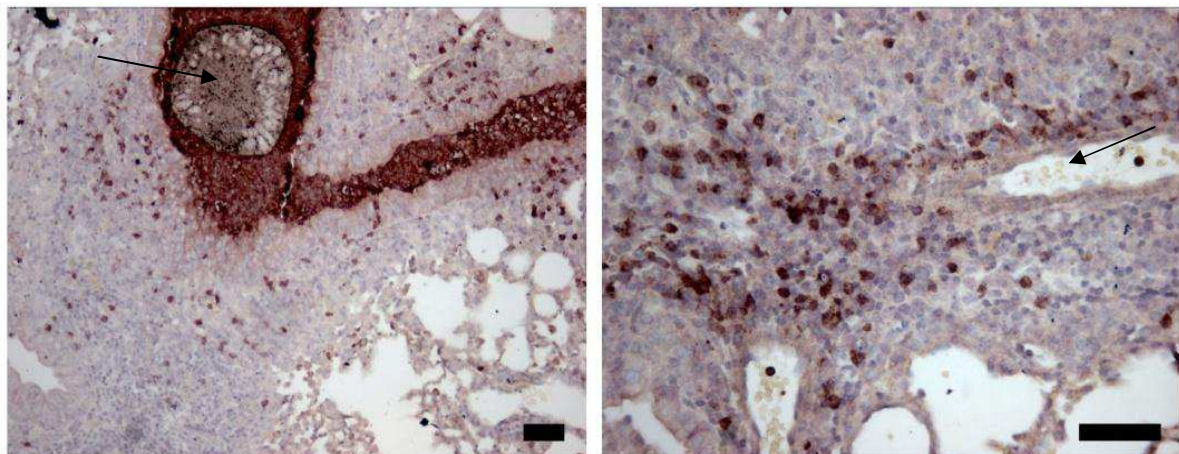
Le nombre de CFU par souris décroît avec le temps avec la persistance de d'environ  $10^2$  CFU de *Pseudomonas aeruginosa* dans les poumons au 7<sup>ème</sup> jour post instillation, témoignant d'une infection chronique. Par contraste, les poumons des souris instillées avec des billes stériles sont restés stériles en culture à tous les temps expérimentaux.

## Résultats histologiques

Les premières observations concernant l'aspect histologique de notre modèle murin d'infection bronchique persistante ont porté sur l'afflux de cellules inflammatoires dans les bronches des souris infectées. Nous avons remarqué que l'instillation de billes contenant du *Pseudomonas aeruginosa* provoquait dès J1 un infiltrat intra-luminal de cellules inflammatoires qui entouraient les billes infectées et persistait à J7. Cet infiltrat n'était pas retrouvé chez les souris instillées avec des billes stériles, chez lesquelles seules quelques cellules inflammatoires étaient retrouvées à J1 et disparaissaient ultérieurement.

Les cellules recrutées dans la lumière bronchique étaient principalement des polynucléaires neutrophiles comme l'a démontré un immunomarquage avec un anticorps dirigé spécifiquement contre les polynucléaires neutrophiles (**Figure 9**).

**Figure 9 : Afflux de polynucléaires neutrophiles dans la lumière bronchique.**

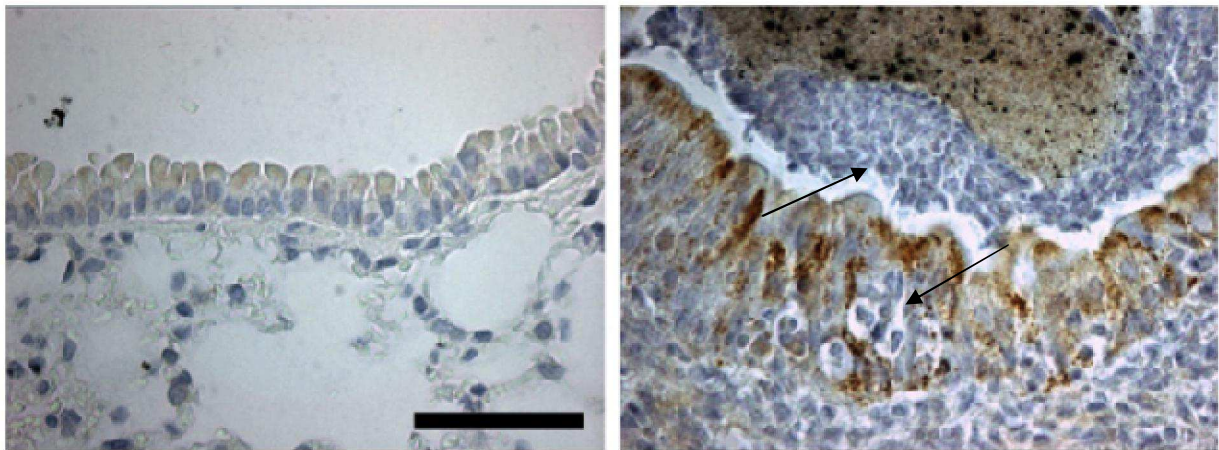


**Légende :** Photographies représentatives de l'immunomarquage avec un anticorps anti-neutrophile des tissus pulmonaires de souris infectées par le *Pseudomonas aeruginosa* et sacrifiées à J7. Les souris infectées par *Pseudomonas aeruginosa* présentent un afflux de polynucléaires neutrophiles (**marquage foncé**) de la circulation bronchique vers les zones endobronchiques autour des billes. A gauche il s'agit d'un grossissement à 100X qui permet de visualiser une coupe de bronche avec une bille d'agarose infectée (**flèche**) intraluminaire entourée d'une multitude de polynucléaires neutrophiles qui obstruent la bronche. A droite il s'agit d'un grossissement plus important (200X) qui permet d'observer l'extravasation des polynucléaires neutrophiles (**marquage foncé**) de la lumière vasculaire bronchique (**flèche**) vers les zones infectées. Barres = 50  $\mu$ m.

D'autre part, il existe un recrutement de macrophages alvéolaires qui se concentrent au niveau des alvéoles périphériques au foyer d'infection, mais également dans la lumière bronchique en périphérie de la bille. Ces macrophages ont été visualisés par des immunomarquages avec un anticorps dirigé contre le CD68 chez la souris (**non représenté**)

L'infection bactérienne s'est accompagnée de remaniements épithéliaux importants avec une hyperplasie de l'épithélium qui a triplé d'épaisseur 7 jours après l'instillation des billes contenant du *Pseudomonas aeruginosa*.

**Figure 10: Remaniements morphologiques épithéliaux.**



Contrôle

PAO1 J7

**Légende :** Photographies représentatives des remaniements morphologiques épithéliaux provoqués par l'infection bronchique prolongée par *Pseudomonas aeruginosa*. L'épithélium bronchique de la souris « Contrôle » à **gauche** est trois fois moins épais que celui de la souris infectée par le *Pseudomonas aeruginosa* et sacrifiée à J7, « PAO1 J7 » à **droite**. Les deux photographies ont été réalisées au même grossissement initial (400X ; barre = 50 µm). Le marquage épithélial marron correspond à un immunomarquage pour VEGF-A, alors que la bille d'agarose intraluminaire est colorée en noir par l'encre de chine. On observe à **droite** des polynucléaires intra bronchiques en périphérie de la bille et infiltrant l'épithélium (**flèches**).

En conclusion, notre modèle animal comporte une infection bronchique à *Pseudomonas aeruginosa* persistant au moins jusqu'à 7 jours après l'instillation de billes d'agarose. Il s'accompagne d'un afflux de cellules inflammatoires dans les bronches et les alvéoles adjacentes et de modifications de la morphologie épithéliale. Ce modèle apparaît donc adapté à l'étude de l'infection bronchique prolongée sur les modifications inflammatoires et structurales chez la souris. Nous avons mis à profit ce modèle pour l'étude de la synthèse pulmonaire de VEGF et de la vascularisation péribronchique. Ces données ont fait l'objet d'un article original en cours de publication qui est détaillé dans les pages suivantes.

**3. 1<sup>er</sup> article: Actuellement en révision (European Respiratory Journal, impact factor 5,53; 27 septembre 2010)**

**Title: *Pseudomonas aeruginosa* induces VEGF synthesis in airway epithelium *in vitro* and *in vivo***

***Subtitle: Possible relevance to peribronchial angiogenesis***

Clémence Martin<sup>\*è</sup>, Guiti Thévenot<sup>\*</sup>, Sophie Danel<sup>\*è</sup>, Jeanne Chapron<sup>\*è</sup>, Asmaa Tazi<sup>\*H</sup>, Julie Macey<sup>\*</sup>, Daniel J. Dusser<sup>\*è</sup>, Isabelle Fajac<sup>\*è</sup> and Pierre-Régis Burgel<sup>\*è</sup>.

\*Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, UPRES EA 2511, Paris, France.

<sup>è</sup>Service de Pneumologie et Service de Physiologie, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France.

<sup>H</sup>Service de Bactériologie, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France.

Corresponding author: Pierre-Régis Burgel MD, PhD.  
27, rue du Faubourg Saint Jacques  
75 679 Paris Cedex 14, France.  
E-mail: [pierre-regis.burgel@cch.aphp.fr](mailto:pierre-regis.burgel@cch.aphp.fr)  
Tel: +33 (1) 58 41 23 71  
Fax: +33 (1) 46 33 82 53

Running title: *P. aeruginosa* induces VEGF in airway epithelium

Word count: ~3900 words.

Keywords: airway epithelium, angiogenesis, bacterial infection, hemoptysis, vascular endothelial growth factor, epidermal growth factor receptor.

**ABSTRACT** (max 200 words, current 196)

**Background:** *Pseudomonasaeruginosa* (PA) airway infection and bronchial blood vessel proliferation are features of bronchiectasis. Because vascular endothelial growth factor-A (VEGF) regulates angiogenesis, we hypothesized that PA infection induces VEGF synthesis in epithelium and peribronchial angiogenesis. Because EGF receptors (EGFR) activation regulates VEGF synthesis in cancer, we also evaluated the roles of EGFR.

**Methods:** Airway epithelial (NCI-H292) cells were incubated for 24h with PA supernatants and VEGF concentrations were measured in culture medium by ELISA. C57BL/6 mice were instilled intratracheally with sterile or with PAO1-coated ( $6.10^5 \pm 3.10^5$  CFU/animal) agarose beads with or without the EGFR inhibitor AG1478 (12.5 mg/kg/d, i.p.). Epithelial immunostaining for VEGF and phosphorylated EGFR, and peribronchial vascularity were quantified using morphometric analysis. VEGF expression was further assessed by western blot in mouse lung homogenates.

**Results:** PA supernatants induced dose-dependent VEGF synthesis in cultured airway epithelial cells, effects which were prevented by EGFR antagonists. In mice, persistent PAO1 infection increased immunostaining for VEGF and phosphorylated EGFR in airway epithelium, and resulted in increased peribronchial vascularity within 7 days. These effects were reduced by EGFR inhibition.

**Conclusion:** Persistent PA infection induced VEGF synthesis in airway epithelium and peribronchial angiogenesis, at least in part, via EGFR-dependent mechanisms.



## INTRODUCTION

Bronchiectasis is defined as persistent or recurrent bronchial sepsis related to irreversibly damaged and dilated bronchi [1, 58]. *Pseudomonas aeruginosa* (PA) is one of the most frequently isolated pathogens from the lower respiratory tract in bronchiectasis [59]. Hemoptysis, a potentially life-threatening complication in subjects with bronchiectasis, is characterized by airway bleeding that usually originates from bronchial blood vessels. Unlike the pulmonary circulation, the bronchial circulation has an ability to proliferate [6] and bronchiectasis is the most common pulmonary condition associated with bronchial angiogenesis (the generation of new blood vessels from existing bronchial vessels) [7, 14]. Although massive hemoptysis is a rare event, blood-staining of sputum or low volume of frank bleeding are quite frequent and have been related to infective exacerbations [59]. However, the mechanisms underlying abnormal bronchial angiogenesis occurring in bronchiectasis are unknown.

The vascular endothelial growth factor-A (VEGF) appears a key angiogenic mediator [7]. It is a vascular endothelial mitogen for arteries and veins and it regulates capillary permeability by inducing the fenestration in endothelial cells [60]. VEGF is synthesized by various respiratory cells, including airway epithelial cells [61], and Baluk et coll. have shown that its expression in airway epithelium was sufficient to trigger tracheal angiogenesis in mice [10]. Various cytokines such as interleukin-1 and TNF-alpha increased the expression of VEGF in airway epithelial cells [62], suggesting that infection and inflammation may trigger VEGF synthesis and angiogenesis.

Our aim was to study the involvement of persistent bronchial infection in the development of bronchial angiogenesis in experimental models relevant to bronchiectasis. To do so, we first studied VEGF synthesis in vitro in airway epithelial cells upon incubation with

PA bacterial products. Because there is no animal model known to develop bronchiectasis, we used a mouse model of prolonged bronchial infection created by intratracheal instillation of PA-coated agarose beads [51] to study airway VEGF expression and peribronchial vasculature. Because recent evidence suggested that various infectious stimuli in the airways lead to activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) [40] and because EGFR has been shown to be pro-angiogenic, albeit in tumors [47], we further studied in vitro and in our mouse model if EGFR could be involved in PA-induced VEGF synthesis and angiogenesis.

## METHODS

### In vitro experiments

NCI-H292 cells, a human pulmonary mucoepidermoid carcinoma cell line, were obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC). Cells were plated at  $2 \times 10^5$  cells/ml in 12- or 24-well plates (BD Falcon) and were grown to confluence in RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum, penicillin (100 units/ml), streptomycin (100  $\mu\text{g/ml}$ ), L-glutamine (2 mM), Glucose (4.5 g/L) and HEPES (25 mM), at 37°C in a humidified, 5% CO<sub>2</sub>/95% air, water-jacketed incubator.

For preparation of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) supernatants, bacteria were grown in trypticone soy broth dialysate (TSBD) medium with aeration at 37°C to late log phase. The broth cultures were then centrifuged at 10,000 rpm for 50 min [63]. Supernatants were harvested and kept at  $-80^\circ\text{C}$  until used.

To assess the dose-dependent effect of the laboratory strain PAO1 on VEGF synthesis, confluent epithelial cells were incubated in the presence of PAO1 supernatants (dilutions, 1:32 to 1:8 in cell culture medium) for 24h. Supernatants of six strains of PA (3 nonmucoid and 3 mucoid; dilution, 1:8) obtained from the sputum of CF patients were also studied. In selected studies, cells were pretreated with inhibitors or with antibodies (Ab) for 30 min before exposure to PA supernatants. The following products were used: AG1478 ( $10^{-5}\text{M}$ , Calbiochem, Nottingham, UK), a selective inhibitor of EGFR tyrosine kinase; PD98059 ( $10^{-5}\text{M}$ , Calbiochem), a mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) inhibitor; SB203580 ( $10^{-5}\text{M}$ , Calbiochem), a p38-MAP kinase inhibitor; LY294002 ( $10^{-5}\text{M}$ , Calbiochem), a phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) inhibitor; an EGFR-neutralizing Ab (Ab-3, C225, 4  $\mu\text{g/ml}$ ; Calbiochem). Concentrations of inhibitors and Abs were selected based on previous literature [42]. After the 24h-incubation in the presence of PA supernatants, cell culture media

were harvested and concentrations of immunoreactive VEGF were measured by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's protocol. Each sample was measured in duplicate.

## **Animal studies**

### Preparation of sterile and PAO1-coated agarose beads

Sterile and PAO1-coated agarose beads were prepared according to slight modifications of the method described by van Heeckeren and Schluchter [51]. Briefly, 1 ml of PAO1 suspension ( $5.4 \times 10^9 \pm 1.9 \times 10^9$  CFU) was mixed with 8.5 ml of 50°C pre-warmed 2% agarose type XII (Sigma, St Louis, MO, USA) in phosphate-buffered saline (PBS), and 0.5 ml of Indian ink (to allow bead visualization in tissue). This agarose-broth mixture was added to 150 ml of heavy mineral oil (Sigma) equilibrated at 50°C. The mixture was then stirred for 6 minutes at room temperature, then cooled over at 4°C with continuous stirring for 20 minutes and finally centrifuged for 20 minutes at 3200g. The beads were washed three times with 10 mL of 0.5%, 0.25% and finally no sodium deoxycholate (Sigma) in PBS. The rate of stirring and cooling was determined to obtain beads with a median size of 300  $\mu$ m. Bead size was further secured by filtration through 400 and 300  $\mu$ m filters. Beads were diluted in sterile PBS to obtain a 20% bead concentration. To estimate the number of bacteria entrapped in beads, aliquots of bead suspensions were homogenized, and were plated on trypticase soy agar for bacterial culture. Control beads were prepared as described above without the addition of PA and were found to be sterile when cultured on trypticase soy agar.

### Mouse infection model

Six-week-old female C57BL/6N mice were purchased from Harlan (Gannat, France) and housed in conventional conditions. Mice were anesthetized with a ketamine-xylazine (15-2 mg/ml) solution administered intraperitoneally (0.1 ml/10 g of weight), and were intubated with a 20-g canula attached to a 1 ml syringe. A 150  $\mu$ L inoculum of sterile or PAO1-coated beads (containing  $6.10^5 \pm 3.10^5$  CFU) was instilled through the canula into the trachea. In selected experiments, mice were treated intraperitoneally with the selective inhibitor of EGFR tyrosine kinase AG1478 (12.5 mg/kg/d) [56] or with vehicle, 24h before instillation of PAO1-coated beads and daily until sacrifice. Mice were sacrificed at day 1 and day 7. To confirm that persistent airway infection was present at day 7 after instillation of PAO1-coated beads, animals were sacrificed and 10-fold dilutions of left lung homogenates were plated on trypticase soy agar: Mean $\pm$ SEM bacterial counts at day 7 were  $8.4 \times 10^2 \pm 3.8 \times 10^2$  CFU/lung (n=14 animals), confirming that persistent airway infection occurred in our model. No bacteria were detected in lung homogenates of animals that were instilled with sterile beads (*not shown*). The study was performed in accordance with the European Community Guidelines and complied with the procedures of our Institut Fédératif de Recherche (Paris, France).

### Immunohistochemical staining and morphometric analysis

For histological analysis, lungs were removed after flushing 4% paraformaldehyde through the right heart, and were fixed in 4% paraformaldehyde and included in paraffin. Five  $\mu$ m-paraffin sections were prepared and stained as described previously [64]. The following primary Abs were used: a polyclonal rabbit Ab raised against the N-terminus of VEGF-A (A-20, dilution 1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); a polyclonal goat Ab

raised against the phosphorylated (activated) EGFR (dilution 1:50, sc-16803; Santa Cruz Biotechnology); a polyclonal rabbit Ab raised against the endothelial marker von Willebrand factor (vWF; Dako, Glostrup, Denmark) to identify peribronchial blood vessels. Antigen unmasking by incubation with protease from *Streptomyces griseus* (0.01%, Sigma) for 20 min was required to improve the quality of staining for vWF. Biotinylated anti-rabbit or anti-goat Ab (1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) were used for secondary Ab and bound Ab were visualized according to standard protocols for avidin-biotin-peroxidase complex method (Elite ABC kit; Vector). Tissue sections were counterstained with haematoxylin. Omission of primary antibodies and incubation with irrelevant immunoglobulins were used as negative controls.

Quantitative morphometric analysis was performed by 2 independent observers using a light microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) connected to a computer [65]. Measurements of volumes occupied by phospho-EGFR and VEGF immunostaining in airway epithelium were performed by point counting using a grid [66, 67]. Volumes occupied by positively-stained cells were expressed per volume of epithelium (%). For each animal, 40 randomly selected high power fields (400X) of bronchial epithelium in two different tissue sections were assessed. Peribronchial blood vessels were identified using immunostaining for vWF. Volumes of blood vessels in the peribronchial compartment (located between the epithelium basement membrane and the alveolar attachments [68]) were also estimated using point counting. Numbers of small (<15  $\mu\text{m}$ ), medium (16-35  $\mu\text{m}$ ) and large (>35  $\mu\text{m}$ ) diameter blood vessels in the peribronchial space were counted for at least 10 bronchi (150 - 200  $\mu\text{m}$  of internal diameter) at 200X magnification, as previously described [68].

### Western blot for VEGF protein

For western blot analysis, lungs were retrieved, weighed and placed for 30 seconds in lysis buffer (CellLytic MT, 0.5 ml/100 mg of weight, Sigma) containing protease inhibitors (Complete Mini; Roche, Basel, Switzerland). Homogenates were kept at 4°C for 15 minutes before centrifugation at 3,000g during 15 minutes at 4°C. Supernatants were harvested and total protein concentrations in lung homogenates were determined by using the bicinchoninic acid-based protein assay kit (Pierce, Fischer Scientific, France). Samples containing 20 µg of total proteins were subjected to electrophoresis through a 12.5% sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel, and were transferred to polyvinylidene difluoride membrane(Bio-Rad, France). After blocking with 5% non-fat powdered milk in Tris-buffered saline/Tween 20, blots were incubated overnight with rabbit polyclonal antibody to VEGF-A (A-20, 1:1500; Santa Cruz Biotechnology). Blots were then washed with Tris-buffered saline/Tween 20, incubated for 45 minutes with secondary biotinylated anti-rabbit antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:15000; Vector Laboratories), and were developed using the enhanced chemiluminescence method (Kit ECL Plus, Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA). The molecular weights of VEGF-A (34-45kD) and  $\beta$ -actin (42 kD) being close, stripping was performed before re-probing membranes with a rabbit polyclonal anti- $\beta$ -actin antibody (1:5000; Abcam, Cambridge, UK). Bands were scanned for densitometry analysis and normalized for protein loading by calculating the VEGF/ $\beta$ -actin ratio.

### **Statistical analysis**

Data obtained from in vitro experiments are presented as mean $\pm$ SEM of at least 3 independent experiments performed in duplicate. Data obtained from measurements of VEGF

protein concentrations in cultured airway epithelial cells were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements followed by the post-hoc Student-Neuman-Keuls test for multiple comparisons. For in vivo experiments, each experiment was performed in a minimum of 8 mice per condition. Data obtained from morphometric analysis were analyzed using the non-parametric Kruskal-Wallis test followed by the post-hoc Dunn's test. The interobserver coefficients of variation for morphometric measurements were less than 15%. All analyses were performed by using the Prism 5 software (GraphPad Inc., USA). Values of  $P < 0.05$  were considered to indicate statistical significance.



## RESULTS

### ***Pseudomonas aeruginosa* supernatants increase VEGF production in human airway epithelial (NCI-H292) cells.**

Under baseline conditions, NCI-H292 cells produced low concentrations of VEGF protein (**Figure 1**). Incubation of the cells with supernatant of the *Pseudomonas* laboratory strain PAO1 induced a dose-dependent increase in VEGF protein concentrations (**Figure 1A**). This increase was 3-fold at dilution 1:32 ( $P<0.05$ ) and went up to 5-fold at dilution 1:8 ( $P<0.01$ ). Although lower in magnitude, a similar increase in VEGF concentrations was observed after cell incubation with supernatants prepared from clinical strains of PA ( $P<0.05$  for all strains) (**Figure 1B**). By contrast, supernatants from the *Staphylococcus aureus* (SA) laboratory strain N315 and supernatants from 8 SA clinical (obtained in sputum) isolates did not induce VEGF production (*data not shown*).

### **EGFR-ERK1/2 signaling pathway is involved in PA-induced VEGF production in NCI-H292 cells.**

Because epidermal growth factor receptor (EGFR) activation by its ligands induces VEGF production in various cell types [46, 47], and because PAO1 supernatant has been shown to activate EGFR in airway epithelium [42], we hypothesized that PA supernatants induced VEGF synthesis *via* EGFR activation. When NCI-H292 cells were pretreated with a selective EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478 (10 $\mu$ M) that prevents EGFR phosphorylation, there was no increase in VEGF concentrations upon incubation with PAO1 supernatant ( $P<0.01$ ) (**Figure 2A**). Pretreatment with AG9 (10  $\mu$ M, an inactive analog of AG1478) was without effect (*data not shown*). PAO1 supernatant-induced VEGF production

was also prevented by pre-incubation with an EGFR neutralizing Ab ( $P<0.01$ ) (**Figure 2A**), but not with an irrelevant Ab (*data not shown*).

Studies have shown that PAO1 supernatant-induced EGFR activation in airway epithelial cells resulted in activation of downstream kinases, including ERK1/2, PI3K, and p38 MAPK [42]. Pretreatment of NCI-H292 cells with a selective ERK1/2 inhibitor (PD98059) reduced PAO1 supernatant-induced VEGF production by 2-fold ( $P<0.01$ ). However, pre-incubation with a selective PI3K inhibitor (LY294002) or with a p38 MAPK inhibitor (SB203580) had no effect on VEGF concentrations (**Figure 2B**).

### **Persistent PAO1 airway infection induces VEGF expression in the airway epithelium in mice.**

In Control mice (no instillation), immunostaining for VEGF was weak and localized to airway epithelium (**Figure 3**). In mice that have received intratracheal instillation of sterile agarose beads, a weak immunostaining for VEGF was observed in the airway epithelium at day 1 and day 7 after instillation (**Figure 3**). By contrast, in mice instilled with PAO1-coated beads, resulting in persistent airway infection at day 7 (see Methods), increase in VEGF immunostaining was observed in the airway epithelium at both day 1 and day 7 after instillation (**Figure 3**). Morphometric analysis indicated a significant 1.5 fold increase in epithelial VEGF staining at day 7 ( $P<0.05$  as compared with Control mice, and  $P<0.05$  as compared with mice instilled with sterile beads; **Figure 4A**). VEGF protein expression was further examined by western blot in mouse lung homogenates. Results confirmed that VEGF expression was increased at day 7 in lungs of mice instilled with PAO1-coated beads (**Figure 4B and C**).

## **Role of EGF receptor activation in VEGF expression in mouse airway epithelium in vivo**

As our in vitro studies have demonstrated that VEGF synthesis upon PA-supernatant stimulation was dependent on EGFR activation, we studied phosphorylated (activated) EGFR in mouse bronchial epithelium. In control mice, epithelial staining for phosphorylated EGFR was low (**Figure 3 and 4D**). Similarly, in mice that have received intratracheal instillation of sterile beads, epithelial staining for phosphorylated EGFR was low and did not change between day 1 and day 7 after instillation (**Figure 3 and 4D**). By contrast, whereas staining for phosphorylated EGFR was low in the epithelium of mice instilled with PAO1-coated beads at day 1, a significant 2-fold increase in EGFR immunostaining was observed at day 7 ( $P<0.01$  as compared with Control mice, and  $P<0.01$  as compared with mice instilled with sterile beads) (**Figures 3 and 4D**).

To further examine the role of EGFR activation in VEGF airway epithelial expression in mice upon PAO1-coated beads instillation, mice were treated with the EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478 (12.5 mg/kg/d; i.p.) or with vehicle, before intratracheal instillation of PAO1-coated beads and daily until sacrifice at day 7. There was no difference in phosphorylated EGFR expression between mice instilled with PAO1-coated beads and treated with vehicle, and mice that have only been instilled with PAO1-coated beads (**Figure 4D**). As expected, treatment with AG1478 resulted in a very low phosphorylated EGFR staining in the airway epithelium ( $P<0.01$  as compared with results in mice that were instilled with PAO1-coated beads and treated with vehicle alone) (**Figure 4D**). When expression of VEGF was studied, there was no difference in VEGF expression between mice instilled with PAO1-coated beads and treated with vehicle, and mice that have only been instilled with PAO1-coated beads (**Figure 4A**). However, VEGF staining in airway epithelium was reduced by 2-fold in mice treated with the EGFR inhibitor ( $P<0.001$  as

compared with results in mice that have been instilled with PAO1-coated beads and treated with vehicle; **Figure 4A**).

### **Persistent PAO1 airway infection induces peribronchial angiogenesis in mice**

As epithelial VEGF is an angiogenic factor for airway blood vessels [10], we next examined whether instillation of PAO1-coated beads resulted in peribronchial angiogenesis. Blood vessels in the peribronchial compartment were studied using the endothelial marker von Willebrand factor (vWF). Morphometric analysis of volume occupied by vWF staining in the peribronchial compartment showed no significant difference between control mice and mice instilled with sterile or PAO1-coated beads (*data not shown*). A morphometric analysis was then performed that differentiated between small (<15  $\mu\text{m}$ ), medium (16-35  $\mu\text{m}$ ) and large (>35  $\mu\text{m}$ ) peribronchial blood vessels as described by Lee et al [68] (see Methods). Instillation of sterile beads had no effect on blood vessel counts according to their size. In contrast, instillation of PAO1-coated beads resulted in a marked increase in small blood vessels counts at day 7, whereas no effect was observed on medium and large vessel counts (**Figures 5A and 5B**). Treatment of mice with AG1478 reduced, but did not abolish, increase in small blood vessel numbers in mice instilled with PAO1-coated beads.

## DISCUSSION

Our results show VEGF synthesis by airway epithelial cells upon *Pseudomonas aeruginosa* stimulation both in vitro and in vivo. *Pseudomonas aeruginosa*-induced VEGF synthesis was associated in vivo with increased numbers of small peribronchial blood vessels. Administration of EGFR inhibitors reduced PA-induced VEGF synthesis in cultured airway epithelium and in mouse airway epithelium, and small peribronchial vessels in vivo.

VEGF has been shown to be expressed by alveolar type II cells, airway epithelial cells, smooth muscle cells, fibroblasts and alveolar macrophages [61]. In our study and under baseline conditions, VEGF synthesis by bronchial epithelial cells was low, both in vitro and in mice. This is in accordance with previously published studies: Lee et al have shown low levels of VEGF expression in normal human bronchial epithelial cells under basal conditions [19] and Corne et coll. have found low expression of VEGF in the bronchial epithelium of C57BL/6 mice [69]. However, upon incubation in the presence of PA supernatants in vitro or in the presence of persistent PAO1 infection in vivo, we observed that VEGF synthesis by airway epithelial cells markedly increased. Although VEGF was expressed in other cell types (e.g., macrophages; *not shown*), these data implicate airway epithelium as a major site of VEGF synthesis after bacterial stimulation.

Our study is the first to show in vitro and in vivo increased VEGF synthesis by airway epithelial cells upon exposure to *Pseudomonas aeruginosa*. It is strengthened by the fact that both the laboratory strain PAO1 and several clinical PA strains induced VEGF expression in vitro. Our data is consistent with the report of increased VEGF synthesis by chondrocytes after a 6h exposure to PA supernatants [70]. In the latter study, the authors also reported induction of VEGF synthesis in chondrocytes exposed to *S. aureus* supernatants [70], whereas in the present studies various strains of *S. aureus* were without effect on VEGF synthesis in

airway epithelium. These differences may be related to different behavior of airway epithelial cells vs. chondrocytes or to different bacterial strains. Importantly, infectious agents other than PA may also enhance VEGF synthesis in airway epithelium. For example, the respiratory syncytial virus (RSV) has been shown to stimulate VEGF synthesis in vitro in airway epithelial cells and in vivo in nasal secretions in patients [19]. Altogether, these data support the concept that airway infection may be associated with increased VEGF expression in airway epithelium.

Inflammatory mediators released by airway epithelium or by recruited inflammatory cells in response to PAO1 infection may have contributed to the induction of VEGF synthesis by airway epithelium in vivo [62]. However, our in vitro studies clearly indicated that soluble products of PA had direct effects on airway epithelium, resulting in VEGF synthesis. The present study was not designed to identify specifically which products in PA supernatants were responsible for EGFR activation and VEGF synthesis. It is likely that PA lipopolysaccharide (LPS) participated in this process because we found that purified PA LPS induced VEGF synthesis in airway epithelial cells dose-dependently, and that PA-induced VEGF synthesis persisted when PAO1 supernatant was boiled or treated with proteases before incubation with epithelial cells (Martin C. and Burgel PR; personal communication). Further studies will be necessary to identify soluble products responsible for PA-induced VEGF synthesis in airway epithelium.

We found that PA-induced VEGF synthesis in vivo and in vitro was dependent, at least partly, on EGFR activation. Mechanisms leading from bacterial stimuli to EGFR activation require discussion. Airway epithelium is the first line of defense against invading pathogens and senses bacterial signals via cognate receptors (e.g., Toll-like receptors) [40]. Koff et al. have recently shown that activation of various Toll-like receptors by their recombinant ligands induced VEGF synthesis in cultured airway epithelial cells via a cascade of events

culminating in EGFR activation [71], but the role of specific bacterial stimuli was not studied [71]. Interestingly, Varoga et coll. have shown that activation of TLR2 by *S. aureus* supernatant resulted in ERK1/2-dependent VEGF synthesis in cultured human chondrocytes, but the role of EGFR activation in this process was not explored [70]. We speculate that TLRs play roles in PA-induced EGFR activation and VEGF synthesis, but further studies will be required to establish these mechanisms.

The number of small peribronchial vessels had increased 7 days after instillation of PAO1-coated beads. This time-course is consistent with previous studies that showed that 7 days after intranasal inoculation of *Mycoplasma pulmonis* in various strains of mice, modifications in tracheal microvasculature and endothelial cell proliferation occurred [18, 72]. This rapid angiogenesis was also observed in the absence of bacterial stimulation. In a tet-on transgenic mouse model in which VEGF was selectively overexpressed in the airway epithelium under the control of a tissue-specific promoter, endothelial sprouting was observed 1 day after switching on VEGF expression, and a 2-fold increase in vessel density had occurred by day 7 [10]. The overexpression of VEGF in airway epithelium following PA infection *in vivo* suggests that PA-induced peribronchial angiogenesis is mediated by a similar interaction between epithelial VEGF and endothelial VEGF receptors. Studies using VEGF receptors antagonists will be required to confirm this hypothesis. Additionally, although increased peribronchial vascularity induced by PA was reduced by EGFR inhibition, the exact role of EGFR in this process was not determined. This could be due to a direct effect of the EGFR antagonist on endothelial cells or to an indirect effect related to reduction of VEGF synthesis in airway epithelium.

The relationship between chronic bronchial infection and hemoptysis has been long known in patients with bronchiectasis [59]. Our report, which is consistent with these observations in humans, is the first to experimentally show a relationship between bronchial

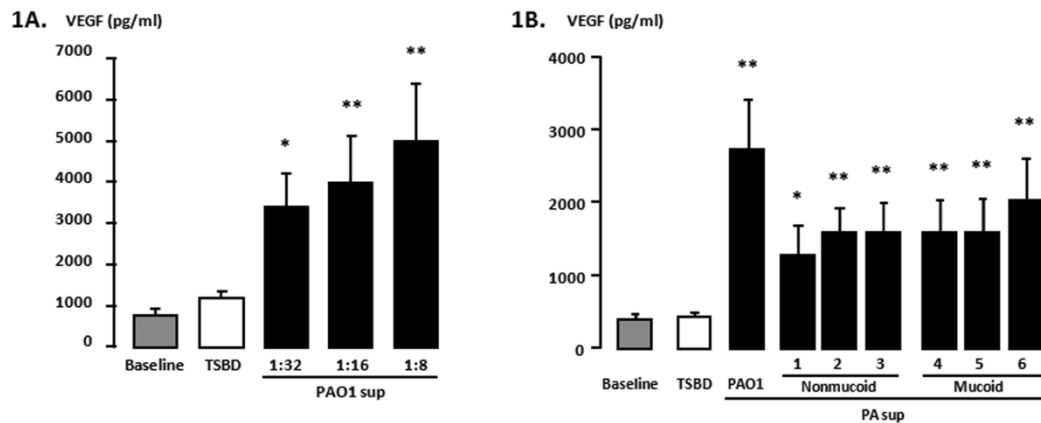
infection with PA and peribronchial angiogenesis. It suggests a role for chronic airway infection in the development of an abnormal bronchial circulation containing multiple tortuous and hypertrophic blood vessels. Although bleeding from these blood vessels may involve several additional steps that were not explored in the present study, we speculate that intensive antibiotic therapy against persistent PA infection may help reducing abnormalities in the bronchial circulation in patients with bronchiectasis.

In conclusion, we showed that exposure of airway epithelium to PA products increased expression of VEGF synthesis *in vitro* and *in vivo*, at least in part via EGFR activation. PA-induced VEGF synthesis was associated with rapid peribronchial angiogenesis. We suggest that the effects of EGFR inhibitors in reducing bronchial angiogenesis in chronic airway inflammatory diseases (e.g. bronchiectasis) need to be further examined in humans. Ultimately, it may prove a promising approach to reduce angiogenesis triggered by persistent bacterial infection and by doing so, to prevent life-threatening hemoptysis in patients with bronchiectasis and previous hemoptysis.



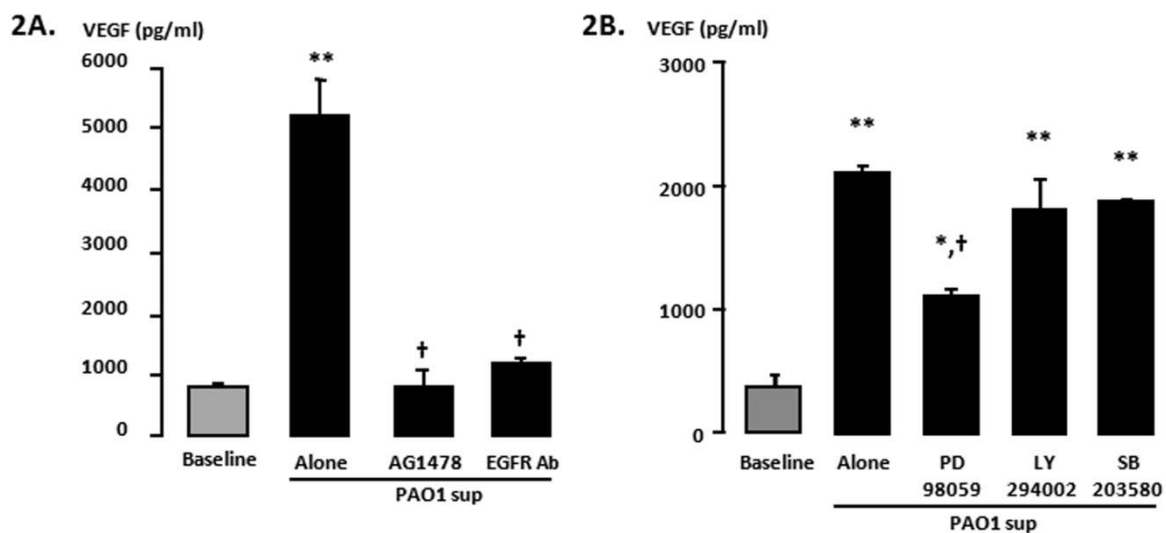
## FIGURES

**Figure 1:** Effects of *Pseudomonas aeruginosa* supernatants on VEGF production in NCI-H292 cells.



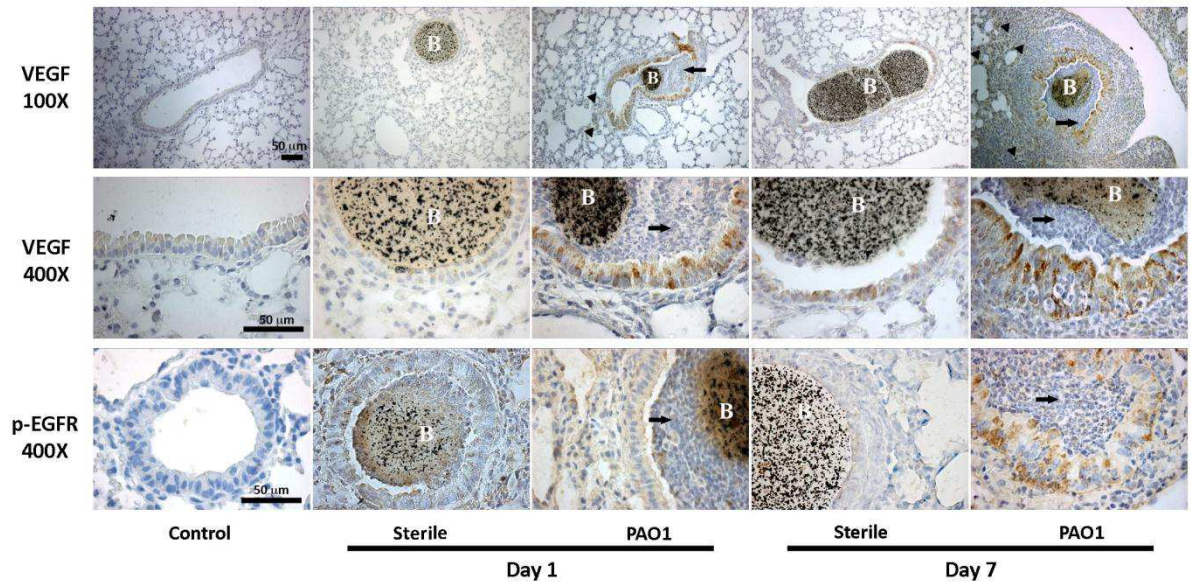
Confluent NCI-H292 cells were cultured in cell culture medium alone (Baseline), in the presence of the bacterial culture medium trypticone soy broth dialysate (TSBD, 1:8 dilution) or incubated with *Pseudomonas aeruginosa* (PA) supernatants (sup) for 24h. VEGF protein concentrations were measured by ELISA in cell culture medium at 24h. **A:** Cells were treated with serial dilutions (from 1:32 to 1:8) of PAO1 supernatant. **B:** Cells were treated with PAO1 supernatant or with supernatants prepared from six different clinical strains of PA (three nonmucooid and three mucooid, labeled 1 to 6; dilution 1:8). Data are mean  $\pm$  SEM (n=3 separate experiments in duplicate). \*,  $P < 0.05$  and \*\*,  $P < 0.01$  compared to Baseline.

**Figure 2:** Role of EGFR-ERK1/2 signaling pathway in *Pseudomonas aeruginosa* supernatant-induced VEGF production in NCI-H292 cells.



**A:** Confluent NCI-H292 cells were incubated for 24h with PAO1 supernatant (PAO1 sup, 1:8 dilution) alone or were pre-treated with a selective EGFR tyrosine kinase inhibitor (AG1478) or an EGFR neutralizing Ab (EGFR Ab). VEGF protein concentrations were measured by ELISA in cell culture medium at 24h. **B:** Cells were treated with PAO1 supernatant (PAO1 sup, 1:8 dilution) alone or were pre-treated with a selective ERK1/2 inhibitor (PD98059), a selective PI3K inhibitor (LY294002) or a selective inhibitor of p38 MAPK (SB203580). Data are mean±SEM (n=3 separate experiments in duplicate). \*,  $P<0.05$  and \*\*,  $P<0.01$  compared to Baseline; †,  $P<0.01$  compared to PAO1 sup alone.

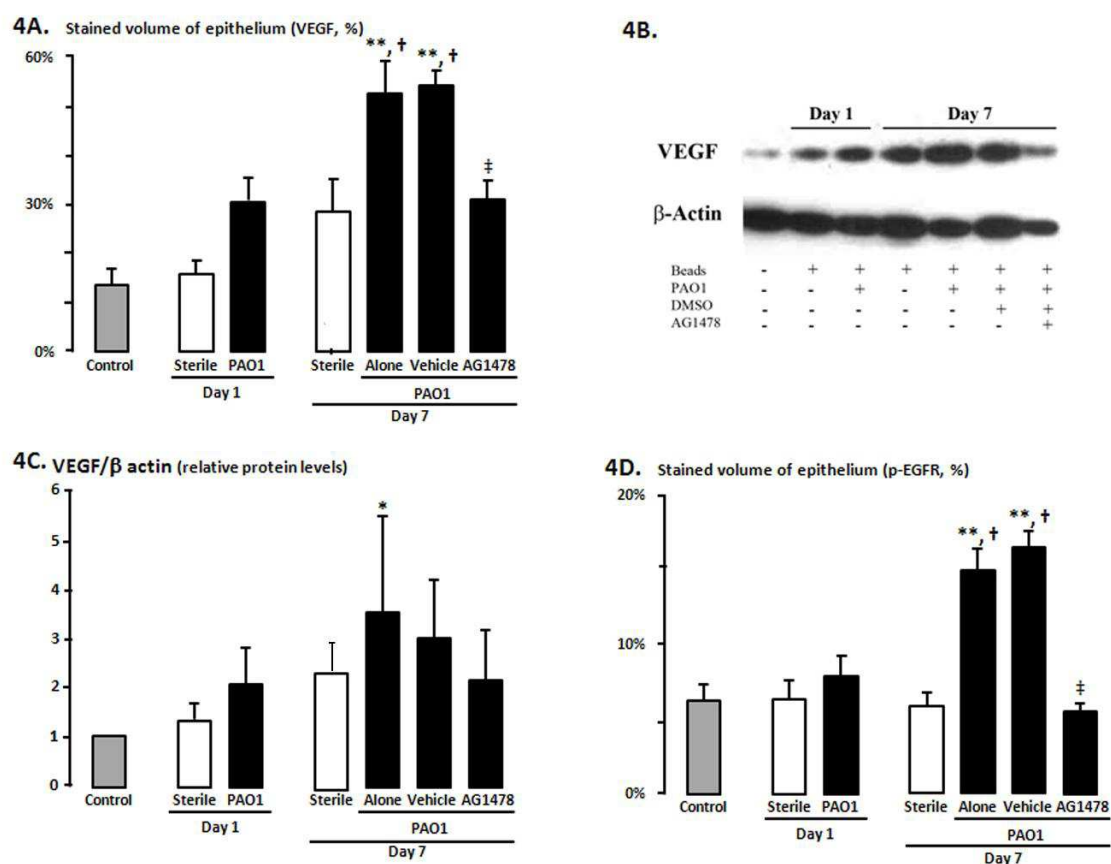
**Figure 3:** Representative photomicrographs of immunostaining for VEGF and phosphorylated EGFR in control mice, and in mice instilled with sterile or with PAO1-coated beads.



Airway tissue sections were obtained from mice without instillation (Control), and after 1 day and 7 days in mice that received intratracheal instillation of sterile or PAO1-coated beads (B). Sections were stained with antibodies to VEGF (upper and middle panels) and to phosphorylated-EGFR (p-EGFR, lower panel) and were counterstained with hematoxylin. In Control mice, weak or no staining for VEGF and p-EGFR were present in epithelium. Instillation of sterile beads only resulted in a small increase in VEGF staining in epithelium at day 7. However, instillation of PAO1-coated beads induced a marked increase in VEGF and p-EGFR staining (*brown staining*) in epithelium. At low magnification (upper panel), airway epithelium appears as a major site of VEGF expression after PAO1 infection. Higher magnification (middle panel) shows granular staining for VEGF throughout the epithelium after PAO1 infection that also resulted in the recruitment of numerous inflammatory cells (mostly neutrophils, arrows) in the airway lumens and in the adjacent alveoli (arrowheads). Photomicrographs are representative of results obtained in at least 8 animals per condition.

All bars 50  $\mu$ m. Original magnifications 100X (upper panel), and 400X (middle and lower panels).

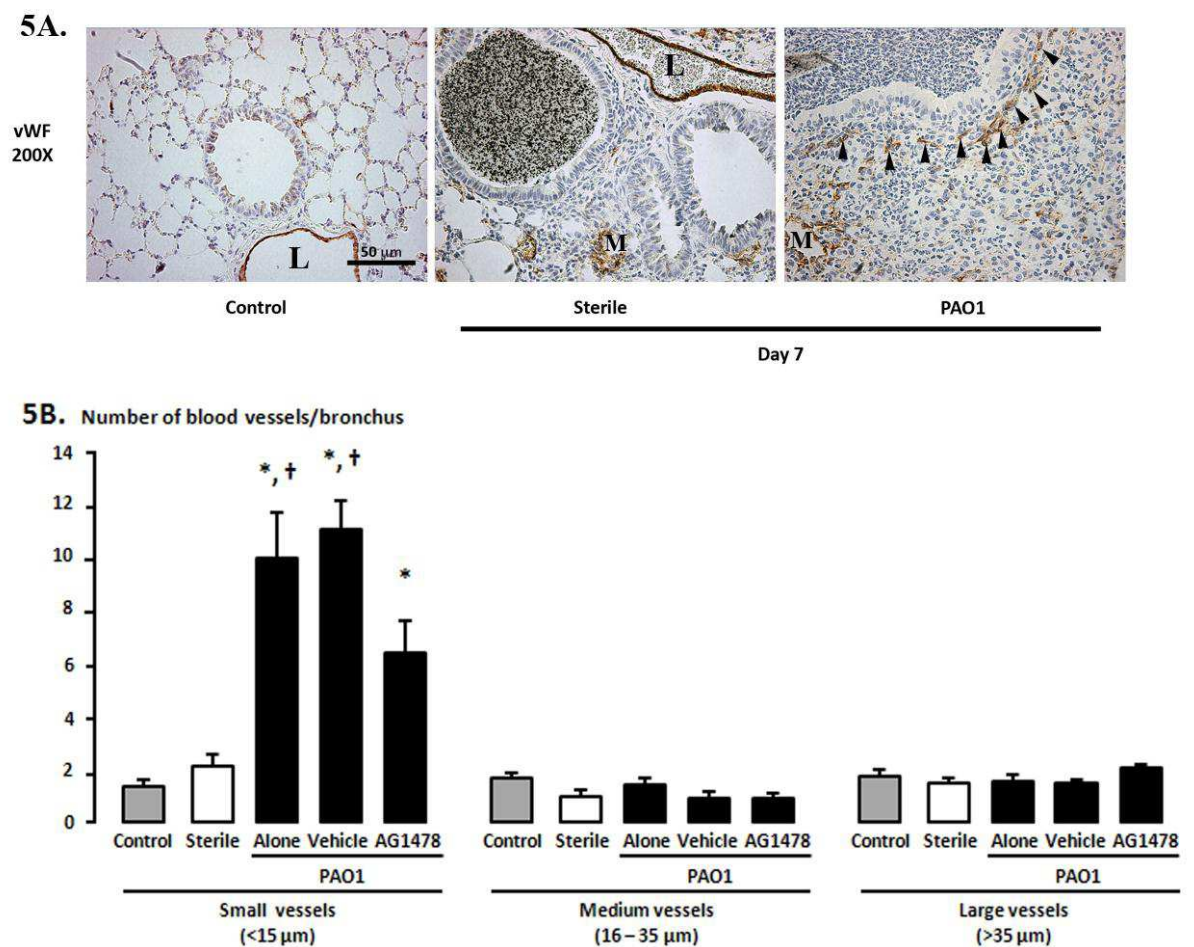
**Figure 4:** Effects of PAO1 infection on VEGF expression and EGFR phosphorylation in mouse airways.



Mice were sacrificed without instillation (Control), and 1 day and 7 days after intratracheal instillation of sterile or PAO1-coated beads. In some experiments, mice were pretreated with AG1478 (12.5 mg/kg/d, i.p.) or with vehicle (DMSO), 24 hours before instillation and daily until sacrifice at day 7. **A:** Airway sections were immunostained for VEGF protein and morphometric analysis of VEGF immunostaining in airway epithelium was performed. **B:** Representative western blot for VEGF protein in lung homogenates. Membrane

were stripped and reprobbed with an Ab to  $\beta$ -Actin to normalize for protein loading. **C:** Quantification of relative VEGF protein levels in western blots of lung homogenates. **D:** Airway sections were immunostained for phosphorylated EGFR (p-EGFR) and morphometric analysis of p-EGFR immunostaining in airway epithelium was performed. Data are mean $\pm$ SEM from at least 8 mice per condition for morphometric analysis and 4 mice per condition for western blotting. \*,  $P < 0.05$  and \*\*,  $P < 0.01$  as compared with Control;  $\ddagger$ ,  $P < 0.01$  as compared with sterile beads at day 7; and  $\text{H}$ ,  $P < 0.01$  as compared with PAO1-coated-beads-instilled mice at day 7.

**Figure 5:** Effects of PAO1 airway infection on peribronchial blood vessels in mice.



Airway tissue sections were obtained from mice without instillation (Control), and 1 day and 7 days after intratracheal instillation of sterile or PAO1-coated beads. In some experiments mice were pretreated with AG1478 (12.5 mg/kg/d, i.p.) or with vehicle, 24 hours before instillation and daily until sacrifice at day 7. **A:** Representative photomicrographs of immunostaining for von Willebrand factor (vWF), an endothelial marker for identification of peribronchial blood vessels (brown color). Although large (L) and medium (M) blood vessels are present adjacent to airways in Control and in instilled animals, only animals instilled with PAO1-coated beads have numerous small peribronchial blood vessels (right panel, **arrowheads**). Bar 50  $\mu\text{m}$ . Original magnification 200 X. **B:** Small ( $<15\mu\text{m}$ ), medium (16-35 $\mu\text{m}$ ) and large ( $>35\mu\text{m}$ ) vWF-positive peribronchial blood vessels were counted as described previously [68]. Data are mean $\pm$ SEM from at least 8 mice per condition. \*,  $P<0.001$  as compared with Control and  $\hat{e}$ ,  $P<0.05$  as compared with mice instilled with sterile-beads.

#### 4. Commentaire de l'éditeur et des lecteurs de l'European Respiratory Journal.

**Courrier de Peter Hiemstra (Leiden, The Netherlands), éditeur associé à l'European Respiratory Journal, suite à la soumission de cet article**

27-Sep-2010

ERJ-01349-2010

Dear Dr Burgel:

Your manuscript entitled "*Pseudomonas aeruginosa* induces VEGF synthesis in airway epithelium in vitro and in vivo" has been reviewed by me and by expert reviewers. Based on the reviewer's recommendations, our own views, and the editorial standards used by the Editorial Board, we have to inform you that your manuscript cannot be accepted in its present form.

However, we will reconsider this decision if you are prepared to submit an adequately revised manuscript.

**The main points of criticism can be summarized as follows:**

**Main issues summarized by the associate editor:**

Both reviewers considered your manuscript to be of interest, but have comments that do require additional experiments. In addition, I would like you to consider the possibility of using the online depository to reduce manuscript length.

**The full comments of the reviewers were the following:**

**Reviewer: 1**

**Comments to the Author**

ERJ-01349-2010: *Pseudomonas aeruginosa* induces VEGF synthesis in airway epithelium in vitro and in vivo. Martin Clémence et al

This very well written and interesting manuscript is clearly the result of a lot of hard work. As pointed out by the authors, the ERJ guideline on MS length is 3000 words for original manuscripts. At 3,900 words the manuscript exceeds the guideline. I have indicated some areas where the manuscript could be cut down, but also feel that more data is required and it is understandable that this large body of work may exceed the guideline for number of words.

**General comments**

Bronchiectasis is a disease characterized by chronic bronchial sepsis and exerts considerable morbidity in those affected. In approximately 50% of cases the aetiology is idiopathic. There is insufficient research into bronchiectasis and treatment options are limited.

The authors aimed to make a novel study of the involvement of `persistent bronchial infection\_ in airway angiogenesis in an experimental model relevant to bronchiectasis. The study focused on VEGF, a `major molecule in angiogenesis\_, in cultured airway epithelial cells upon incubation with bacterial products. The cell work was limited to working with a cancer cell line. The authors used a mouse model of prolonged bronchial infection to mimic bronchiectasis showing EGFR activation, VEGF production and (persuasive data), changes in airway small vessel numbers.



The data were consistent with VEGF synthesis by airway epithelial cells upon *Pseudomonas aeruginosa* stimulation in vitro and in vivo. *Pseudomonas aeruginosa*-induced VEGF synthesis was associated with increased numbers of small peribronchial blood vessels. Administration of EGFR inhibitors supported the involvement of this pathway in VEGF synthesis/ and increase in small peribronchial vessels.

The report, proposed a link between the findings and the clinical problem of haemoptysis in this patient group, although this was not supported by experimental data. It was suggested that EGFR activation might be a target for therapy aiming at the prevention of recurrent haemoptysis in bronchiectasis.

This is an ambitious and worthy study but has problems associated with the complexity of the biology. It could be simplified by concentrating on the morphometry aspects of the work.

### **Major comments**

The hallmark of bronchiectasis is infection and sepsis accompanied by the production of inflammatory cytokines. Although VEGF is a principal angiogenic growth factor it is firmly established that the inflammatory cytokines also can drive vascular changes e.g the following are potentially important drivers of angiogenesis: Growth factors VEGF, bFGF, HGF. Cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-15, IL-17 etc. (Angiogenesis in rheumatoid arthritis. Autoimmunity. 2009 Nov;42(7):563-73).

Many of these factors would be raised upon a bacterial challenge of the mouse and so specificity for the :VEGF finding~ are questionable in vivo. At least some of these could be measured by multiplex ELISA, and could at least be commented upon.

This point should be informed by the in vitro cell data, but here the data is restricted to the use of a cancer cell line (to study a proposed :EGFR dependent ~ process!), challenged with bacterial broths.

There is at least one report that commercially available LPS does not cause an increase in VEGF production from lung transplant primary epithelial cells (J Heart Lung Transplant. 2008 Nov; 27(11):1210-6). This should at least be discussed e.g is this because *Pseudomonas* is being studied?

The present study requires confirmation of the VEGF up regulation in human derived primary epithelial cells using a purified, bronchiectasis relevant, LPS. Primary cells are commercially available. Patient cells are preferable.

Specificity for the findings were implied in the present study by showing that *Staphylococcus aureus* laboratory strain N315 and clinical sputum supernatants did not induce VEGF production.

The most common microbes in chronic colonization at our centre and in the literature are *Haemophilus influenzae* and *Pseudomonas aeruginosa* and it would be of interest to obtain data on primary cells challenged with *Haemophilus influenzae* and *Pseudomonas aeruginosa*

The implication of the clinical finding of hemoptysis is made repeatedly but with no data. Some evidence e.g staining for plasma proteins would help.

**Areas that could be cut down:**

The data on downstream kinase signaling could be cut [ERK1/2, PI3K, p38 etc). In contrast, the very interesting finding of increased number of small vessels in vivo suffers from lack of detailed methods. Although referenced I think 2-3 sentences are important.

### **Minor comments:**

The introduction (119-20) states that : `bronchiectasis is the most common pulmonary condition associated with bronchial angiogenesis". Might this upset some asthma researchers, where angiogenesis is topical in airway remodelling studies?

### **Reviewer: 2**

#### Comments to the Author

Summary (provided by authors). *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most frequently isolated pathogens from the lower respiratory tract in bronchiectasis. In this paper, Martin et al examined the role of *P. aeruginosa* during peribronchial angiogenesis and hemoptysis, potentially life-threatening complications in patients with bronchiectasis. However, the mechanisms underlying bronchial angiogenesis occurring in bronchiectasis are unknown. They examined the impact of *P. aeruginosa* on the expression of EGFR-regulated VEGF, an inducer of angiogenesis. Their results support the hypothesis that *P. aeruginosa* stimulates the expression of VEGF both in vitro and in vivo. *P. aeruginosa*-induced VEGF synthesis was associated in vivo with increased numbers of small peribronchial blood vessels. Administration of EGFR inhibitors reduced *P. aeruginosa*-induced VEGF synthesis in cultured airway epithelium and in mouse airway epithelium, and increased small peribronchial vessels in vivo. Overall, this is a concise report demonstrating a link between bronchial infection with *P. aeruginosa* and peribronchial angiogenesis. The paper is well written. A few controls and changes have been suggested to improve the manuscript. Minor critiques of the paper are listed below:

## Comments:

Fig. 1. Staphylococcus aureus is commonly recovered from the lungs of CF and some bronchiectasis patients. Inclusion of data from S. aureus will be important to demonstrate the specific activities of P. aeruginosa supernatant. Also, it is not understood why other more prominent pathogens in bronchiectasis, including Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae were not used as controls.

## Fig. 2.

1. VEGF inhibitor should have been used as control for direct comparison.

2. Also, because EGFR regulate a barrage of cellular processes, inhibitors of EGFR and downstream ERK1/2 kinases are predicted to be cytotoxic. The authors need to provide evidence that the cells are not in overt distress.

3. In both Figures 1 and 2, exposure of NCI-H292 cells to live PA01 bacteria rather than supernatant would have been more appropriate. I would recommend repeating the experiments in Figures 1-2 with live PA01.

## Figs. 3-4.

1. A western blot examining corresponding increase in EGFR (added to Fig. 4B) will be highly informative.

2. Infection in bronchiectasis airways is usually chronic. 7 days seems a bit short.

## Fig.5.

1. The authors have so far failed to demonstrate a relationship between hemoptysis and bronchial angiogenesis in his animal model.

2. The authors need to discuss the lack of angiogenesis in peribronchi of larger and medium airways.

**Discussion:**

1. Page 15, Line 53. It is surprising that *S. aureus* did not induce the expression of VEGF, contradictory to previous finding by Varoga et al (J Pathol 2006; 210: 315-324). The authors attributed this discrepancy to different cell type (epithelial versus chondrocytes) or to different strains of *S. aureus*, but this could be easily tested, and included as control.

2. Page 16: Lines 20-27. The authors indicated that *P. aeruginosa* PA01 products, rather than inflammatory mediators released by airway epithelium cause the expression of VEGF to promote angiogenesis. However, this is pure speculation. PA01 supernatant could have induced the secretion of cytokines, which in turn induced the expression of VEGF. They should have measured various cytokines with the released by NCI-H292 cells that were exposed to PA01 supernatant by ELISA.

Please revise your manuscript carefully, by addressing all the points raised by the reviewers. We would like to emphasise that the invitation to resubmit a revised manuscript does not necessarily mean it will be accepted in its revised format!

We expect to receive your revised manuscripts within 3 months. If we do not receive a revised manuscript within 6 months without notification, the manuscript will be removed from our files.

Thank you in advance. We look forward to receiving your revised manuscript.

Yours sincerely,

Prof. Pieter Hiemstra

European Respiratory Journal

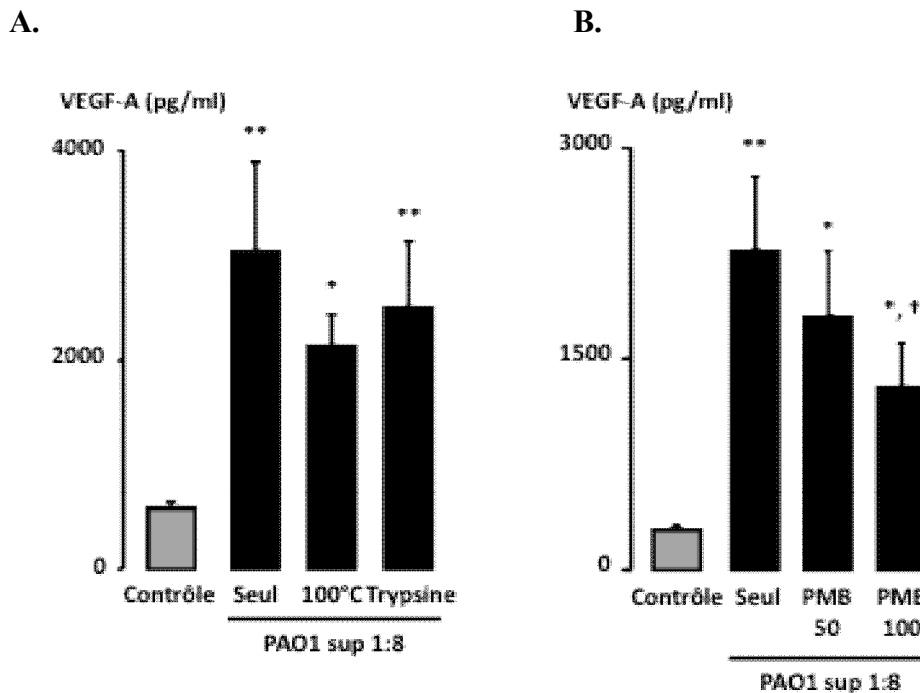
## 5. Données complémentaires.

### a. Caractérisation des produits contenus dans le surnageant de *Pseudomonas aeruginosa* et impliqués dans la synthèse de VEGF-A.

Nous avons tenté de progresser sur l'identification des produits de sécrétion de *Pseudomonas aeruginosa*, présents dans le surnageant de culture bactérien et responsable de la synthèse de VEGF par les cellules NCI-H292. En reprenant la méthode d'investigation décrite par Massion et coll. [63], nous avons soumis le surnageant de culture de *Pseudomonas aeruginosa* à des prétraitements avant de l'incuber avec les cellules épithéliales en culture. Nos données indiquent que l'effet du surnageant de *Pseudomonas aeruginosa* sur la synthèse de VEGF persiste malgré le chauffage du surnageant à 100°C pendant 60 minutes, ou l'incubation en présence d'enzymes protéolytiques tels que la trypsine (40 microg/mL) ou la pronase (2 mg/mL ; non représenté) (**Figure 11A**). Nous avons conclu que les produits sécrétés responsables des effets du surnageant de *Pseudomonas aeruginosa* sur la synthèse de VEGF<sub>165</sub> par les cellules NCI-H292 n'étaient pas de nature protéique ou nucléique.

Nous avons alors étudié le rôle potentiel du lipopolysaccharide (LPS) dans la synthèse de VEGF par les cellules épithéliales en culture. Le prétraitement des surnageants par la polymixine B (Sigma), un antibiotique inhibant la liaison du LPS à son récepteur, a entraîné une réduction dose-dépendante de l'effet du surnageant de PAO1 sur la synthèse de VEGF sans l'inhiber totalement (**figure 11B**). Ces données suggèrent un rôle pour le LPS dans la synthèse de VEGF induite par le surnageant de culture de *Pseudomonas aeruginosa* par les cellules NCI-H292.

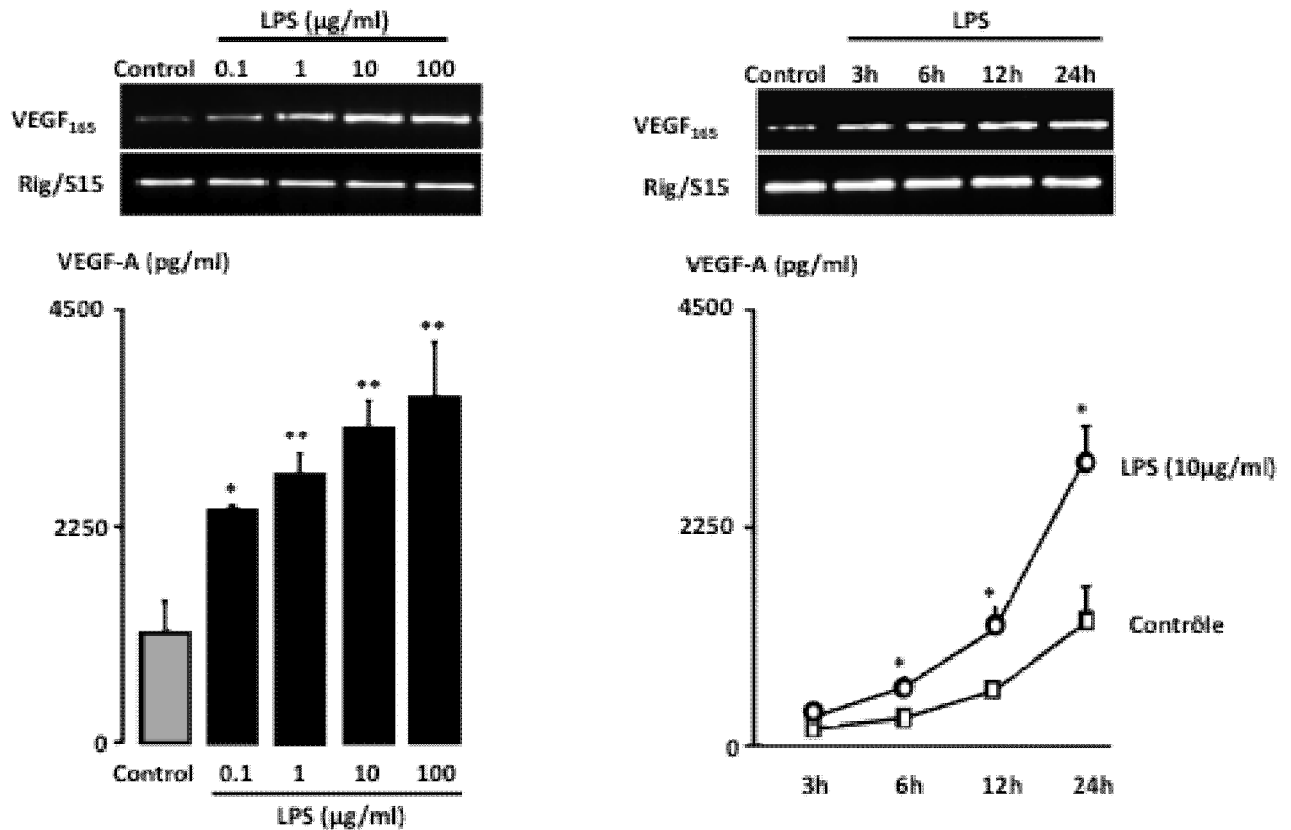
**Figure 11 : Rôle du lipopolysaccharide dans la synthèse de VEGF induite par le surnageant de culture de *Pseudomonas aeruginosa* par les cellules NCI-H292.**



**Légende :** A. Les cellules épithéliales NCI-H292 ont été cultivées seules (Contrôle) ou incubées pendant 24 heures avec les surnageants de culture de *Pseudomonas aeruginosa* O1 (PAO1 sup, dilution 1:8), n'ayant subi aucun prétraitement (seul) ou après chauffage à 100°C pendant 60 minutes (100°C) ou après un prétraitement par la trypsine (Trypsine). B. Les cellules ont été incubées avec le surnageant de PAO1 seul ou prétraité avec des doses croissantes de Polymixine B (50 et 100 µg/ml). Après 24h, les concentrations de VEGF dans le milieu de culture cellulaire ont été mesurées par ELISA. Les données sont représentatives d'au moins 4 expériences indépendantes (\*,  $P < 0,05$  et \*\* $P < 0,01$  par comparaison avec le Contrôle ; et †  $P < 0,05$  par comparaison avec PAO1 seul).

Nous avons alors testé directement l'effet du LPS purifié de *Pseudomonas aeruginosa* (Sigma) sur l'expression de l'ARNm (Figures 12 A et C) et de la synthèse protéique de VEGF (Figures 12 B et D) Celui-ci induit de façon dose et temps dépendante une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine VEGF<sub>165</sub> par les cellules NCI-H292.

**Figure 12 : Rôle du lipopolysaccharide (LPS) purifié dans la synthèse de VEGF sur les cellules NCI-H292.**



**b. Implication des autres bactéries dans la synthèse de VEGF par les cellules NCI-H292**

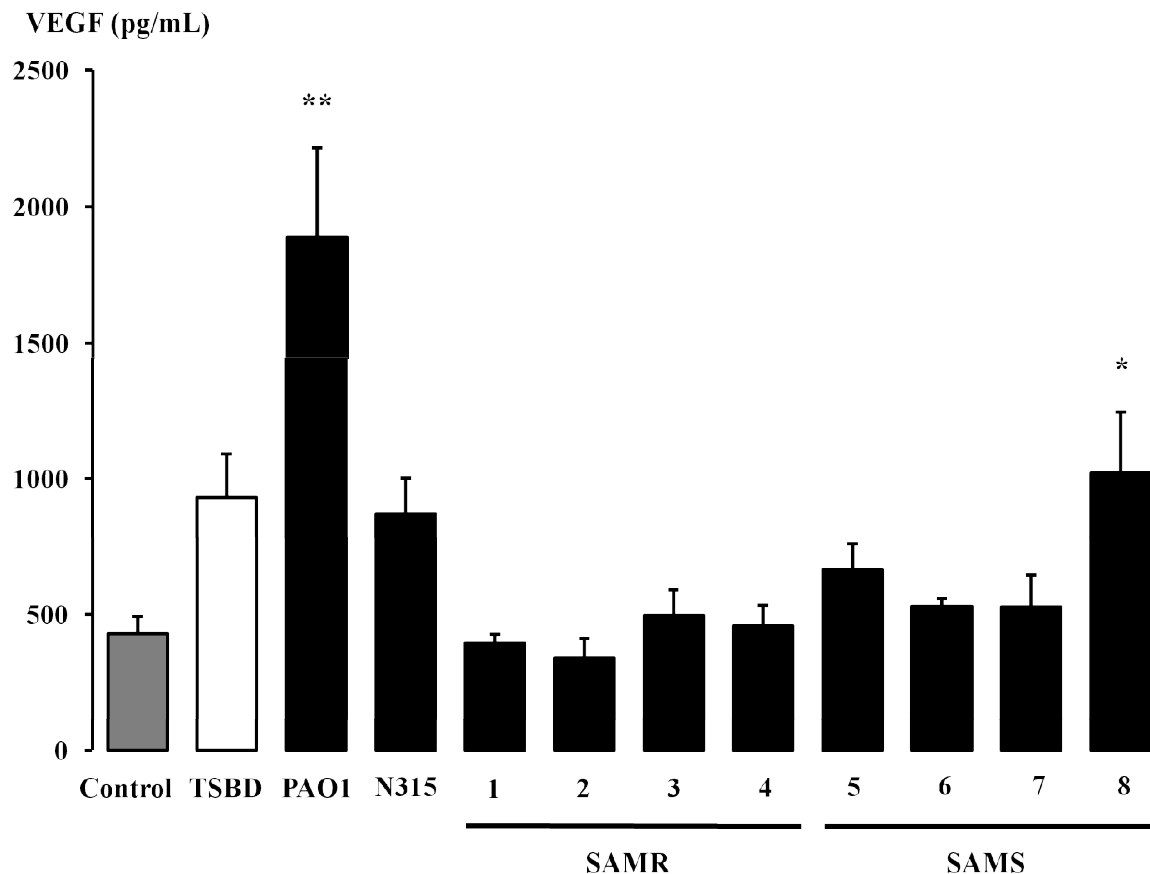
Comme nous l'avons indiqué dans l'introduction, *Pseudomonas aeruginosa* n'est pas la seule espèce bactérienne isolée dans les sécrétions bronchiques des patients atteints de dilatations des bronches. D'autres espèces bactériennes sont fréquemment retrouvés, comme *Staphylococcus aureus* (dans la mucoviscidose), mais également *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae* (dans les dilatations des bronches non mucoviscidosiques). Nous avons évalué l'effet de ces espèces bactériennes sur la synthèse de VEGF par les cellules épithéliales NCI-H292 en culture.



Notre étude a débuté par l'évaluation de l'effet de *Staphylococcus aureus*. Dans les bronches de patients atteints de mucoviscidose, *Staphylococcus aureus* a été localisé en immunohistochimie dans la lumière bronchique (dans les bouchons de mucus) à distance de l'épithélium respiratoire. Cette donnée suggère que dans ce contexte *S. aureus* agisse sur l'épithélium par l'intermédiaire de facteurs sécrétés. Nous avons donc réalisé une série d'expériences exposant les cellules NCI-H292 à du surnageant de *Staphylococcus aureus* (**Figure 13**). Nous avons choisi une souche de laboratoire bien caractérisée de *Staphylococcus aureus* (souche N315, résistante à la méticilline). Nous avons également testé l'effet de souches cliniques de *Staphylococcus aureus* isolées à partir d'expectorations de patients mucoviscidosiques (2 souches sensibles à la méticilline et 2 souches résistantes). Enfin, afin d'augmenter la diversité des souches bactériennes nous avons utilisé 4 souches provenant de sécrétions bronchiques de patients non mucoviscidosiques (2 souches sensibles à la méticilline et 2 souches résistantes). L'effet des surnageants de *Staphylococcus aureus* sur la synthèse de VEGF par les cellules NCI-H292 a été comparé à des cellules cultivées en milieu seul « Contrôles » et à des cellules incubées avec du surnageant de *Pseudomonas aeruginosa* de la souche PAO1. Les bactéries ont été cultivées dans du trypticase Soy Broth Dialysate (TSBD) (*Becton Dickison, Biosciences Europe, Belgique*) pendant 48h jusqu'à la fin de leur croissance logarithmique ( $10^8$  CFU/mL). Les surnageants bactériens ont été séparés des bactéries par centrifugation des bouillons de culture pendant 60 minutes à 9000 rpm, à 4°C, puis filtrés (filtre de 0.22µm pour éliminer les débris bactériens), aliquotés et congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les cellules à confluence ont été incubées pendant 24h avec les surnageants de *Staphylococcus aureus* dilués à 1:8 dans du milieu de culture cellulaire, la concentration de VEGF dans le milieu de culture a ensuite été mesurée par méthode ELISA. Comme montré sur la **Figure 13**, seule une des 9 souches testées (8 souches cliniques et la

souche de laboratoire, N315) a induit une augmentation significative, mais modeste de la synthèse de VEGF par les cellules NCI-H292.

**Figure 13 : Effet des surnageants de culture de *Staphylococcus aureus* sur la synthèse de VEGF par les cellules NCI-H292.**



**Légende :** A confluence, les cellules épithéliales NCI-H292 ont été cultivées seules (Contrôle) ou incubées pendant 24 heures avec du milieu de culture bactérien seul (TSBD) ou avec les surnageants de culture de *Pseudomonas aeruginosa* O1 (PAO1) ou de *Staphylococcus aureus* N315 (N315) ou 8 souches cliniques (1 - 8) de *Staphylococcus aureus* tous dilués à 1 :8 dans le milieu de culture cellulaire. 1 à 4 : souches résistantes à la méticilline. 5 à 8 : souches sensibles à la méticilline. Les souches 1, 2, 4 et 5 sont des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* obtenues auprès de patients atteints de mucoviscidose. Après 24h, les concentrations de VEGF dans le milieu de culture cellulaire ont été mesurées par ELISA. Les données sont représentatives d'au moins 4 expériences indépendantes (\*,  $P < 0,05$  et \*\* $P < 0,01$  par comparaison avec le Contrôle). Seule une seule souche de *Staphylococcus aureus* a un effet discrètement significatif sur la synthèse de VEGF par les cellules épithéliales respiratoires NCI-H292.

Suite à la suggestion des lecteurs de l'European Respiratory Journal, nous testons actuellement l'effet des surnageants d'*Haemophilus influenzae* et de *Streptococcus pneumoniae* sur la synthèse de VEGF par les cellules NCI-H292.

### **c. Expériences en cours et perspectives.**

#### Rôle du LPS de *Pseudomonas aeruginosa* dans la synthèse de VEGF

Comme mentionné par l'un des lecteurs de l'European Respiratory Journal, le rôle du LPS semble varier en fonction des types cellulaires : certains investigateurs ont rapporté l'absence d'effet du LPS (Sigma, espèce bactérienne non précisée) sur la synthèse de VEGF par des cellules épithéliales en culture primaires obtenues à partir de brossage bronchique chez des patients greffés pulmonaires (J Heart Lung Transplant. 2008 Nov; 27(11):1210-6). La discordance entre nos résultats et ceux de ces auteurs pourrait être liée au type de LPS utilisé (espèce bactérienne, pureté) ou au type cellulaire (lignée tumorale vs. culture primaire). Ayant décidé de ne pas inclure les données portant sur le LPS dans notre article, nous avons souhaité limiter les investigations sur ce sujet. Néanmoins, nous avons répété certaines de nos expériences sur la lignée BEAS-2B (une lignée de cellules épithéliales respiratoires transformées par un virus SV40 mais non tumorale). Sur cette lignée, nos données préliminaires indiquent une induction de VEGF par le surnageant de culture de *Pseudomonas aeruginosa* O1 mais pas par le LPS de *Pseudomonas aeruginosa* (Sigma). Nous sommes également en train de confirmer nos résultats sur des cultures primaires de cellules épithéliales obtenues à partir de polypes naso-sinusiens (fournies par l'équipe Pr André Coste, Hôpital Intercommunal de Créteil).

### Effet du surnageant vs. Effet des bactéries vivantes.

Notre étude in vitro a été menée exclusivement avec des surnageants de culture de *Pseudomonas aeruginosa*. Ce choix a été fait compte tenu de la localisation de *Pseudomonas aeruginosa* dans les sécrétions de la lumière bronchique (à distance de l'épithélium respiratoire) chez les patients atteints de dilatations des bronches liées à la mucoviscidose [4]. Comme suggéré par l'un des lecteurs de l'*European Respiratory Journal*, la co-culture de *Pseudomonas aeruginosa* avec des cellules épithéliales pourrait permettre d'étudier les interactions directes entre les bactéries et les cellules épithéliales. Cette suggestion semble pertinente mais nécessitera de nombreuses études qui dépassent le cadre de cette thèse. Des études préliminaires sont en cours et nous envisageons néanmoins d'étudier ce sujet ultérieurement.

### Perspectives sur notre modèle animal d'infection bronchique persistante par *Pseudomonas aeruginosa*

Les applications possibles de ce modèle animal sont multiples. Dans l'immédiat, nos projets se développeront dans plusieurs directions :

**-Une caractérisation de ce modèle sur des périodes plus longue.** L'objectif principal de ces études sera d'étudier si ce modèle conduit à l'apparition de dilatations des bronches. L'étude du nombre et de la taille des bronches dans les poumons des souris est réalisable par des techniques de morphométrie quantitative [67]. L'identification de dilatation des bronches dans ce modèle permettrait d'approcher la physiopathologie de cette affection pour laquelle peu de modèles expérimentaux existent.

**-Une caractérisation plus fine de la vascularisation péribronchique.** Des techniques de moulage de la circulation bronchique sont envisageables [8], ainsi qu'une

caractérisation à l'aide de marqueurs immunohistochimiques permettant d'identifier des néo-vaisseaux et de mieux définir leur caractéristiques morphologiques. Ces études sont actuellement en cours au laboratoire.

-Effets des anti-VEGF sur l'angiogénèse.

-Rôle des cellules inflammatoires dans l'angiogénèse (PNN, Macrophages)

## **2<sup>ème</sup> ETUDE: ANGIOGENESE BRONCHIQUE DE LA MUCOVISCIDOSE : ROLE DE CFTR DANS L'EXPRESSION DE VEGF ET L'ANGIOGENESE BRONCHIQUE**

**(2<sup>ème</sup> article en cours de rédaction)**

### **1. Introduction**

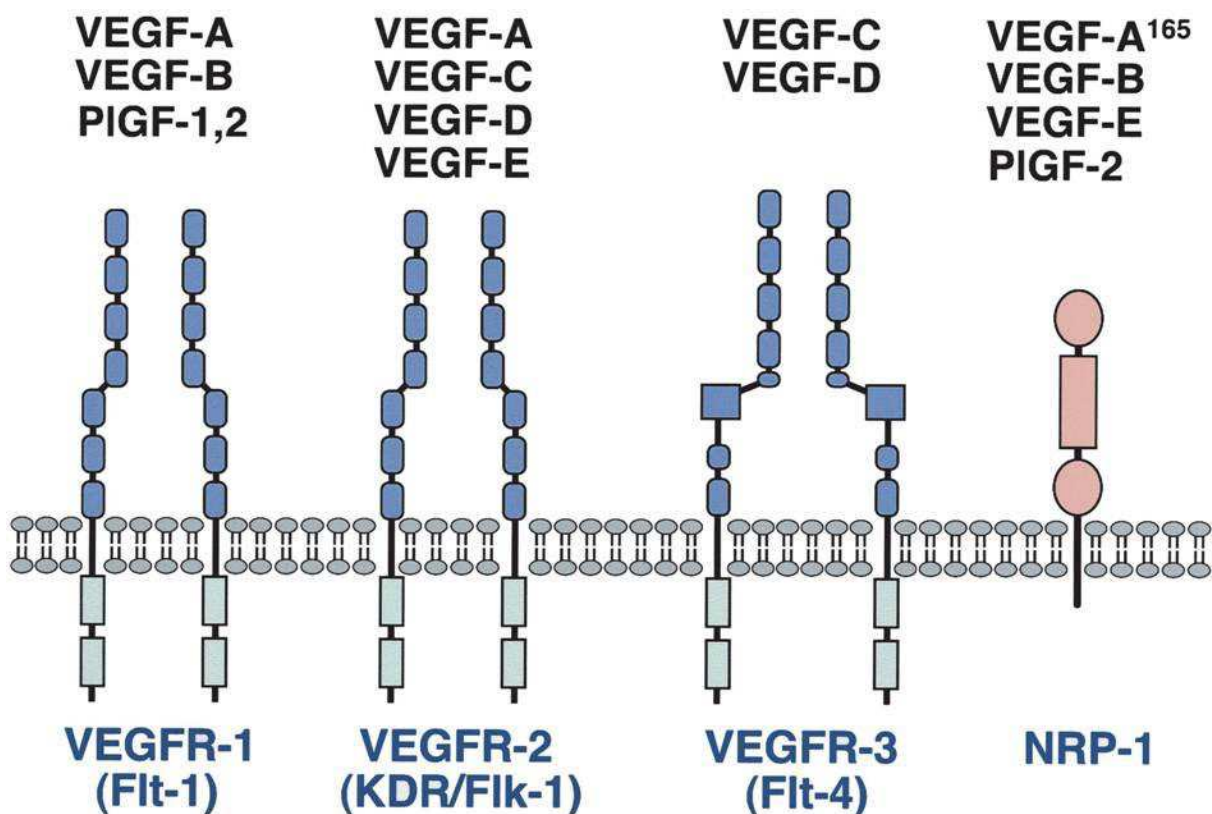
La mucoviscidose est une maladie génétique autosomique récessive résultant de mutations dans le gène cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) qui conduisent à une dysrégulation des transports ioniques épithéliaux [73]. Le pronostic de la maladie est habituellement lié à l'atteinte respiratoire qui est caractérisée par l'apparition progressive de dilatations des bronches responsables d'une insuffisance respiratoire chronique sévère.

Au cours de l'évolution de la mucoviscidose, les hémoptysies sont des complications fréquentes et potentiellement mortelles survenant préférentiellement chez les patients ayant une maladie respiratoire sévère mais pouvant survenir quelle que soit la sévérité de l'atteinte respiratoire [74, 75]. Les artériographies bronchiques réalisées chez les patients Mucoviscidosiques lors d'épisodes d'hémoptysies montrent une hypervascularisation bronchique pathologique développée à partir de la circulation systémique. Le mécanisme de l'angiogenèse des vaisseaux bronchiques (croissance de néo-vaisseaux à partir de vaisseaux existants) est encore méconnu dans cette pathologie.

Les protéines de la famille du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) sont des molécules clés au cours de l'angiogenèse normale et pathologique [15]. Cette famille comporte six isoformes de VEGF (VEGF-A à F). VEGF-A joue un rôle majeur dans l'angiogenèse, les modifications de la perméabilité capillaire [76] et la prolifération des cellules endothéliales [77, 78]. VEGF-A est exprimé dans le tissu pulmonaire par différents types cellulaires : cellules épithéliales respiratoires, pneumocytes I et II, cellules musculaires

lisses mais aussi cellules inflammatoires (macrophages, polynucléaires neutrophiles) [34]. Baluk et coll. ont montré que l'expression transgénique de VEGF-A dans l'épithélium respiratoire provoque une augmentation rapide de la densité vasculaire trachéale chez la souris [10], suggérant l'importance de ce facteur de croissance dans l'angiogenèse bronchique pathologique et un rôle proangiogénique de l'épithélium respiratoire (voir première étude).

Schéma représentant la famille du facteur de croissance endothélial VEGF et ses récepteurs.



Les facteurs de croissance composant la famille VEGF se lient pour certains à la neuropiline et/ou à l'héparane sulfate mais exercent leurs activité via les récepteurs du VEGF (VEGFR), qui sont des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase. On dénombre 3 récepteurs de VEGF : VEGFR1 ou fms-like tyrosine kinase 1 (Flt-1) lie VEGF-A mais présente une faible activité kinase en comparaison avec VEGFR2 ; son rôle serait de limiter l'angiogenèse en séquestrant le VEGF-A en excès. VEGFR2, ou fetal liver kinase 1 (Flk-1) ou encore kinase insert domain-containing receptor (KDR) chez l'homme, est exprimé par les

cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques mais aussi les cellules souches hématopoïétiques et les cellules musculaires lisses. Il possède une forte activité tyrosine kinase et est responsable des effets proangiogéniques de VEGF-A. VEGFR3, récepteur de haute affinité pour VEGF-C et VEGF-D, est exprimé sur les cellules endothéliales lymphatiques et joue un rôle majeur dans la lymphangiogenèse.

Le facteur de croissance placentaire (PlGF) est un homodimère faisant également partie de la famille VEGF dont les 4 isoformes (PlGF-1 à 4) se lient au VEGFR1 [79]. Alors que certaines études attribuent au PlGF un rôle freinateur dans l'angiogenèse par formation d'hétérodimères VEGF-A/PlGF inactifs [80] ou faiblement actifs en comparaison avec les homodimères VEGF-A/VEGF-A [81], la plupart des études s'accordent pour lui reconnaître un rôle pro-angiogénique [82, 83]. Par compétition dans sa liaison avec VEGFR1, PlGF entraînerait la libération de VEGF qui se lierait alors à VEGFR2, conduisant à un effet proangiogénique. La liaison de PlGF avec VEGFR1 pourrait également entraîner la transactivation de VEGFR2 par phosphorylation ou l'activation de VEGFR2 par hétérodimérisation de VEGFR1 avec VEGFR2.

Dans le cadre de la mucoviscidose, il n'existe pas d'études s'intéressant à l'angiogenèse des vaisseaux bronchiques ou à la localisation de l'expression des facteurs proangiogéniques et de leurs récepteurs au sein des voies respiratoires. En effet, la disponibilité de tissus pulmonaires de sujets atteints de mucoviscidose est très limitée : les biopsies bronchiques (et transbronchiques) sont impossibles chez les sujets adultes du fait du risque élevé de complications hémorragiques (liée à une circulation bronchique hypertrophiée) et les prélèvements pulmonaires chirurgicaux sont rares.

Des études préliminaires réalisées dans notre laboratoire ont mis en évidence une hypervascularisation bronchique dans la mucoviscidose associée à une surexpression de



VEGF-A par l'épithélium bronchique (Master 2, Dr Sophie Danel, 2006). Les mécanismes conduisant à l'angiogenèse des vaisseaux bronchiques chez les patients Mucoviscidosiques sont inconnus mais pourraient impliquer les éléments suivants :

- l'infection bronchique chronique caractéristique de la mucoviscidose : les études de notre laboratoire montrent que l'infection par *Pseudomonas aeruginosa* provoque la synthèse de VEGF-A par les cellules épithéliales respiratoires humaines en culture. Chez la souris, l'infection prolongée 7 jours par *Pseudomonas aeruginosa* provoque l'expression épithéliale de VEGF-A et l'angiogenèse péribronchique (Martin et coll., *Eur Resp J* 2010, en révision)

- l'inflammation bronchique : les sujets atteints de mucoviscidose ont des concentrations élevées d'IL-1 $\beta$  et de TNF $\alpha$  dans le lavage broncho-alvéolaire [84] et ces molécules augmentent la synthèse de VEGF-A par les cellules épithéliales respiratoires en culture [62].

- l'hypoxie est un facteur connu pour induire la sécrétion de VEGF [85] et l'obstruction bronchique par des bouchons muqueux dans le cadre de la mucoviscidose entraîne une hypoxie locale des cellules épithéliales bronchiques [4].

- le rôle potentiel de la dysfonction de CFTR dans la synthèse de facteurs de croissance angiogénique par l'épithélium bronchique est suggéré par l'étude de Jeanne Chapron (Master 2, 2008) qui avait montré que VEGF-A était fortement exprimé par l'épithélium respiratoire chez les souris knock-out pour le gène *cftr*.

Les objectifs de notre étude étaient :

- de déterminer si l'hypervascularisation péribronchique existant dans la mucoviscidose s'accompagne d'une surexpression de facteurs proangiogéniques tels que

VEGF ou PlGF et de leurs récepteurs. Pour cela, nous avons donc mis à profit l'accès aux explants pulmonaires issus des patients atteints de mucoviscidose suivis dans le Centre de Ressources et de Compétences pour la Mucoviscidose de l'adulte (Hôpital Cochin, AP-HP) évoluée bénéficiant d'une transplantation pulmonaire. Ces prélèvements ont permis une étude immunohistochimique et morphométrique visant à caractériser l'expression pulmonaire des membres de la famille VEGF/VEGFR en relation avec les modifications structurales des vaisseaux péribronchiques.

- de déterminer si la perte de fonction de CFTR influe sur l'expression des membres de la famille VEGF/VEGFR et l'angiogenèse péribronchique dans la mucoviscidose. Pour cela, nous avons d'abord réalisé une étude immunohistochimique de tissus pulmonaires de souris déficientes pour *cftr* comparées à des tissus de souris sauvages ; dans un second temps, nous avons évalué l'effet d'un inhibiteur de CFTR sur la synthèse de VEGF-A par des cellules épithéliales respiratoires en culture.

## 2. Méthodes

### a. Prélèvements pulmonaires humains

#### Sujets

Nous avons étudié les prélèvements pulmonaires chirurgicaux de deux groupes de sujets non-fumeurs. Le premier groupe (groupe Témoin) était constitué de neuf sujets sans antécédent respiratoire ni colonisation bactérienne, ayant bénéficié d'une lobectomie pour la résection d'un cancer pulmonaire localisé, le plus souvent un adénocarcinome T1N0M0. Dans ce groupe, les prélèvements pulmonaires ont été choisis dans une zone macroscopiquement normale à distance de la tumeur. Le deuxième groupe (groupe Mucoviscidose) était constitué de dix sujets Mucoviscidosiques évoluée ayant nécessité une transplantation pulmonaire. Le diagnostic de mucoviscidose a été affirmé par le résultat d'un test de la sueur positif (concentration d'ions chlorures  $> 60$  mEq/L) et/ou d'une différence de potentiel transépithélial nasal élevée (différence de potentiel  $< -30$  mV), complétés par la mise en évidence de mutations génétiques (recherche des 32 mutations les plus fréquentes) du gène *CFTR* [73]. Dans ce groupe, les tissus pulmonaires ont été obtenus à partir des poumons explantés lors de la transplantation pulmonaire. Les caractéristiques de ces deux groupes de sujets sont résumées sur le tableau 1.

#### Ethique

Le prélèvement et le recueil des tissus pulmonaires chirurgicaux (groupe Témoin) et des explants pulmonaires (groupe Mucoviscidose) ont été effectués en accord avec les règles éthiques en vigueur, en particulier avec les recommandations de la Déclaration d'Helsinki et les recommandations du CPP, Paris-Cochin.

**Tableau 1** : Caractéristiques des sujets Témoins et Mucoviscidosiques

	Témoins (n=9)	Mucoviscidose (n=10)
Homme / Femme	3 / 6	3 / 7
Age (années)	65,9 ± 10,5	35,5 ± 5,6
VEMS (% de la théorique)	97 ± 20	22 ± 7
CVF (% de la théorique)	101 ± 23	33 ± 9
<b>Mutations du gène <i>CFTR</i></b>	ND	10
F508del / F508del	-	7
F508del /N1303K	-	1
F508del /Q890X	-	1
G542X/3849	-	1
<b>Colonisation bronchique *</b>	0	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	1
<i>Haemophilus influenzae</i>	0	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	1
Hémoptysie avec embolisation	0	3

VEMS : volume expiré maximum la 1<sup>ère</sup> seconde; CVF : capacité vitale forcée.

L'âge, le VEMS et la CVF sont présentés en moyenne ± écart-type.

\*La colonisation par plusieurs agents bactériens est possible.

#### Préparation et sélection des prélèvements pulmonaires humains

Les prélèvements pulmonaires chirurgicaux ont été fixés rapidement avec du formol à 10% par instillation intrabronchique à pression constante (25 cmH<sub>2</sub>O) suivie d'une immersion dans le formol pendant 12 heures [86]. Après fixation et déshydratation par passage dans des

solutions d'alcool éthylique de concentrations croissantes puis dans le xylène, les tissus pulmonaires ont été inclus en paraffine. Les blocs de tissus ont été coupés en sections de 5 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome (*Leica Microsystems SA*, Rueil-Malmaison, France). L'analyse de sections colorées par l'hématoxyline-éosine a permis la sélection de blocs tissulaires contenant des bronchioles (définies comme des voies respiratoires non-cartilagineuses et dépourvues de glandes).

Afin de prendre en compte une éventuelle inhomogénéité de distribution des anomalies morphologiques chez les sujets Mucoviscidosiques, nous avons étudié deux blocs de tissus pulmonaires provenant de lobes différents. Pour les sujets du groupe de Témoins, en raison d'une moindre disponibilité des tissus, un seul bloc prélevé à distance du cancer dans une zone macroscopiquement normale a été étudié.

### **b. Prélèvements pulmonaires murins (souris)**

Afin d'étudier in vivo le rôle de la dysfonction de CFTR, nous avons étudié deux souches de souris ayant une dysfonction de *cftr*: l'une invalidée pour le gène *cftr* et l'une comportant une délétion d'une phénylalanine en position 508 du gène *cftr* (la mutation la plus fréquente retrouvée chez les patients atteints de mucoviscidose). Les caractéristiques des souches de souris étudiées sont détaillées ci-après :

(1) Des souris mâles C57BL/6J *Cftr*<sup>m1UNC</sup> obtenues par génie génétique, et fournies par le Centre de Distribution, de Typage et d'Archivage Animal\_ UPS44 CNRS (Orléans, France) : les souris sauvages (exprimant un gène *cftr* normal, *Cftr*<sup>+/+</sup>) (n=7) et les souris invalidées pour *cftr* (*Cftr*<sup>-/-</sup>) (n=7).

(2) Des souris mâles et femelles *Cftr*<sup>tm1Eur</sup> sans et avec mutation homozygote F508del, respectivement *F508 wt/wt* (n=6) et *F508 del/del* (n=6), fournies par Scholte B. (Cell Biology Dept, Erasmus university, PO Box 1738, 3000 DR Rotterdam, NL).

Les souris ont été élevées ensemble par la mère jusqu'à l'âge de 3-4 semaines. Classiquement, les souris *Cftr*<sup>-/-</sup> et *F508 del/del* décèdent rapidement après le sevrage d'une occlusion intestinale distale liée à une obstruction colique par des bouchons muqueux. Un laxatif osmotique (Movicol®) a donc été ajouté dans l'eau de boisson des souris *Cftr*<sup>-/-</sup> pour prévenir l'occlusion intestinale distale et permettre leur survie prolongée.

Les souris ont été sacrifiées entre 8 à 10 semaines de vie. Après le sacrifice, les poumons entiers des souris étudiées en immunohistochimie ont été fixés dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 48h à 4°C puis inclus en paraffine. Les blocs de tissus pulmonaires inclus en paraffine ont été coupés en sections de 5µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome (*Leica Microsystems SA*, Rueil-Malmaison, France). Pour chaque souris, nous avons choisi deux sections pulmonaires distantes l'une de l'autre, afin de minimiser les biais liés à une éventuelle variabilité de l'expression des molécules angiogéniques entre les différentes régions du poumon.

Pour les expériences de Western Blot, des souris C57BL/6J *Cftr*<sup>m1UNC</sup> sauvages *Cftr*<sup>+/+</sup> (n= 13) et invalidées pour *cftr* (*Cftr*<sup>-/-</sup>) (n= 10) et ont été sacrifiées entre 7 et 8 semaines de vie puis leurs poumons ont été prélevés et congelés à -80°C. Les poumons ont été ensuite homogénéisés dans le tampon de lyse (Cell Lytic MT Mammalian, C3228, *Sigma*, St Louis, MO) pendant 30 secondes (homogénéiseur Ultra Turrax IKA T25) puis conservés 30 minutes à 4°C. Les échantillons ont été ensuite centrifugés et aliquotés.

### c. Immunohistochimie

Les sections de tissus pulmonaires ont été déparaffinées par passage dans le xylène, réhydratées dans des bains d'alcool de concentrations décroissantes et traitées avec de l'eau oxygénée à 0,3% dans du méthanol pendant trente minutes, afin de bloquer l'activité peroxydase endogène. Les tissus ont alors été incubés pendant 30 minutes avec du phosphate buffer saline (PBS) contenant de la sérumalbumine bovine (2% ; Fraction V, *Sigma*, St Louis, MO) pour saturer les sites antigéniques non spécifiques. Les anticorps ont été dilués dans du PBS contenant 0,05% de Tween-20 (*Sigma*, St Louis, MO, USA) et 1% de sérumalbumine bovine. La référence et la dilution des anticorps primaires utilisés sont résumées dans le Tableau 2. Selon les anticorps utilisés, un démasquage de l'activité antigénique a été effectué par incubation avec une enzyme protéolytique (protéase de *Streptomyces griseus*, 0,01g dans 15 ml de PBS, *Sigma*, St Louis, MO, USA) pendant 20 minutes.

**Tableau 2 :** Anticorps primaires utilisés pour l'immunomarquage des tissus pulmonaires humains et murins

Anticorps	Distributeur	Référence	Dilution	Démasquage antigénique	Anticorps secondaire	
vWF	Dako	M1505	1 :50	Protéase	Lapin	
VEGF <sub>165</sub> A-20	SC	sc-152	1:200	Aucun	Lapin	
Flt-1	SC	sc-9029	1 :50	Protéase	Lapin	
Flk-1	SC	sc-315	1 :200	Aucun	Lapin	
PlGF	Humain	SC	sc-27133	1 :50	Aucun	Chèvre
	Souris	SC	sc-1882	1 :50	Protéase	Chèvre

SC : *Santa Cruz Biotechnology*, distributeur *Tebu-bio*, Le Perray en Yvelines, France ; Dako : *Dako Cytomation*, Trappes, France

Les tissus ont été incubés avec l'anticorps primaire pendant 1 heure à température ambiante. L'excès d'anticorps primaire a alors été éliminé par un triple rinçage des lames avec du PBS. Les tissus ont ensuite été incubés pendant une heure à température ambiante avec un anticorps secondaire biotinylé anti-lapin ou anti-chèvre selon l'anticorps primaire utilisé (dilution 1:200, *Vector Laboratories*, Paris, France). Les anticorps fixés ont été révélés à l'aide d'une méthode standardisée pour la technique avidine-biotine-peroxydase (Elite ABC kit, *Vector Laboratories*, Paris, France) avec le substrat DAB couleur marron (3,3-Diaminobenzidine; *Sigma*, St Louis, USA). Les sections de tissus pulmonaires ont ensuite été contre-colorées avec de l'hématoxyline pour identifier les structures cellulaires. Les contrôles négatifs ont été réalisés par omission de l'anticorps primaire.

#### **d. Analyse morphométrique quantitative :**

##### Analyse de l'immunomarquage dans l'épithélium bronchique

Pour comparer les immunomarquages des différentes molécules étudiées sur les prélèvements pulmonaires humains et murins, nous avons réalisé une analyse quantitative de la surface d'épithélium marquée par une technique de morphométrie quantitative non biaisée : la méthode d'intersection avec les points [67]. Pour cela, nous avons pris des microphotographies de l'épithélium bronchique à l'aide d'un microscope couplé à une caméra numérique. Pour chaque sujet/souris, 20 microphotographies correspondant à des champs microscopiques choisis au hasard à l'aide d'une grille de sélection ont été effectuées à un grossissement de 400X. Pour la quantification, une grille de comptage composée de points situés à équidistance les uns des autres a été superposée sur les photographies, chaque point correspondant à une surface connue. Les points de la grille faisant intersection avec l'épithélium et ceux faisant intersection avec les zones marquées par les différents anticorps



dans l'épithélium ont été comptés. Pour chaque sujet, le pourcentage d'épithélium marqué par chaque anticorps étudié a été calculé par la formule :  $\frac{\Sigma \text{des points marqués}}{\Sigma \text{des points faisant intersection avec l'épithélium}} \times 100$  [67].

### Analyse quantitative des vaisseaux péribronchiolaires

Nous avons défini les vaisseaux péribronchiolaires comme les structures marquées par l'anticorps anti Facteur von Willebrand (VWF), un marqueur endothélial [33] situées dans l'espace péribronchiolaire défini comme la zone s'étendant sous la membrane basale épithéliale jusqu'à l'espace alvéolaire. Nous avons quantifié le nombre de vaisseaux péribronchiolaires et la surface péribronchiolaire marqués avec l'anticorps anti-Facteur von Willebrand dans chaque groupe en réalisant une analyse morphométrique. Pour cela, nous avons pris des photographies de la surface péribronchiolaire au grossissement 200X à intervalle régulier. Exprimés en médiane [25<sup>ème</sup>-75<sup>ème</sup> percentiles], nous avons analysé 18,5 [12-22] champs microscopiques par sujet du groupe Mucoviscidose (soit 3,07 [2,05-4,02] mm d'épithélium par sujet dans ce groupe) et de 5,5 [2-11] champs microscopiques par sujet du groupe de Témoins (soit 2,25 [0,85-5,13] mm d'épithélium par sujet dans ce groupe). En ce qui concerne l'évaluation quantitative de la vascularisation péribronchique sur les prélèvements murins, nous avons analysé 12 [12-14] champs microscopiques par souris (soit 8,05 [7,11-8,43] mm d'épithélium par souris). La surface totale du sous-épithélium et la surface totale occupée par les vaisseaux dans le sous épithélium ont été quantifiées par la méthode d'intersection avec les points décrite ci-dessus. La longueur de la membrane basale a été mesurée pour exprimer la surface occupée par les vaisseaux dans l'espace péribronchiolaire et le nombre de vaisseaux sous épithéliaux par rapport à la surface totale de l'espace péribronchiolaire et par rapport à la longueur de membrane basale. Nous avons défini et quantifié trois catégories de vaisseaux péribronchiolaire par rapport à la surface totale de l'espace péribronchiolaire: petits vaisseaux ( $\leq 15 \mu\text{m}$ ), vaisseaux moyens (16 à 35  $\mu\text{m}$ ) et gros

vaisseaux ( $>35\mu\text{m}$ ) pour chaque bronchiole selon la technique décrite par Lee et coll. pour étudier la néovascularisation [68].

#### e. Western blot

Les échantillons de poumons frais de souris *Cftr*<sup>+/+</sup> et *Cftr*<sup>-/-</sup> contenant 30 $\mu\text{g}$  de protéines totales, dilués dans du tampon de Laemmli et une solution d'antiprotéase (*Roche*, France), ont été dénaturés 10 minutes à 100°C, puis déposés sur un gel d'électrophorèse de polyacrylamide à 12% en présence de SDS-PAGE. La migration électrophorétique a été réalisée à 100V pendant 90 minutes à 20°C. Les protéines contenues dans le gel ont été ensuite transférées sur une membrane de polyvinylidène fluorure (PVDF, Immobilon-P) dans un système de transfert semi-sec (Trans Blot, *SD-Bio Rad*). Cette étape s'est faite à 0,2 A pendant 75 minutes à température ambiante. La qualité du transfert a été vérifiée en colorant la membrane avec une solution de rouge de Ponceau à 1%. Le blocage de la membrane a été ensuite réalisé par l'incubation pendant une heure dans une solution de PBS-Tween 0,1% et de lait à 5%. La membrane a été ensuite rincée puis incubée pendant 12 heures à 4°C avec l'anticorps primaire : VEGF<sub>165</sub> A-20 sc-152 (*Santa Cruz Biotechnology*, distributeur *Tebu-bio*, Le Perray en Yvelines, France) dilué au 1/1500. La membrane a été ensuite lavée puis incubée pendant 45 minutes à température ambiante avec l'anticorps secondaire : anti-lapin (*Vector Laboratories*, Paris, France) dilué au 1/15000. La membrane a été ensuite lavée, les anticorps ont été révélés par le kit ECL Plus (Enhanced Chemiluminescence, *Amersham*) et le film auto radiographique Hyperfilm (*Kodak*, France) a été mis en contact avec la membrane pendant 3 minutes puis développé.

La membrane a ensuite été réutilisée, rincée, incubée pendant 30 minutes à 56°C dans la solution de Stripping à base de  $\beta$ -mercapto-éthanol, rincée puis nous avons réalisé à

nouveau un blocage de la membrane par PBS-Tween 0,1% et du lait à 5%, l'incubation pendant 12 heures à 4°C avec l'anticorps primaire polyclonal de bêta-actine de lapin (ab8227, *Abcam*, Paris, France) dilué au 1/5000 puis un nouveau rinçage et l'incubation pendant 45 minutes à température ambiante avec l'anticorps secondaire polyclonal de chèvre anti-lapin sc-2004 (*Santa Cruz Biotechnology*, distributeur *Tebu-bio*, Le Perray en Yvelines, France) dilué au 1/20000. La révélation par le kit ECL Plus et le développement du film photographique ont été effectués comme précédemment. L'analyse semi-quantitative a été réalisée en mesurant l'intensité du signal obtenu sur le film photographique pour le VEGF-A par le logiciel Gene Snap 7.02 (*Syngene*, Cambridge, Royaume-Uni) et en l'indexant au signal contrôle obtenu pour la bêta-actine.

#### **f. Culture cellulaire**

Pour tester l'effet d'un inhibiteur de CFTR sur la synthèse de VEGF-A, nous avons utilisé les cellules NCI-H292 (une lignée de cellules épithéliales issue d'un carcinome mucoépidermoïde bronchique). Ces cellules ont été choisies car elles expriment une protéine CFTR fonctionnelle [87] et la protéine VEGF-A à l'état basal [71]. Elles ont étéensemencées sur des plaques de 24 puits (*Multiwell*, *Falcon*) dans du milieu de culture Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, *Sigma*, St Louis, MO), contenant 10% de sérum de veau fœtal, des antibiotiques (pénicilline 10000 UI/mL, streptomycine 10µg/mL) et un antifongique (amphotéricine B 250µg/mL), de la L-glutamine (2mM), et du glucose (0,45g/mL). Les cellules ont été cultivées dans une étuve à 37°C en présence de 5% de dioxyde de carbone jusqu'à confluence.

## Inhibition des transports ioniques dépendant de CFTR

Pour tester le rôle de CFTR dans la synthèse de VEGF-A par les cellules épithéliales en culture, les cellules NCI-H292 ont été prétraitées avec un inhibiteur chimique de CFTR (CFTR inh-172, *Calbiochem, Merck, Germany*) [88]. Cet inhibiteur réalise un blocage puissant, réversible, rapide, voltage-indépendant, et sélectif du canal CFTR ( $K_i=300\text{nM}$ ) [88]. Le CFTR inh-172 a été utilisé à la concentration de ( $20\mu\text{M}$ ) dilué dans du RPMI 1640 ; cette concentration a été choisie d'après les travaux de Ma et coll. et de Perez et coll. [88, 89] montrant qu'à cette dose le CFTR inh-172 inhibe de façon continue pendant 24 h le canal CFTR sur des cellules épithéliales trachéales humaines en culture primaire (HTE). Dans ces expériences, les cellules NCI-H292 ont été cultivées jusqu'à confluence, puis prétraitées par CFTR inh-172 toutes les 24 heures pendant 72 heures avec le CFTR inh-172, comme décrit dans la littérature [89-91]. Le milieu de culture a été changé toutes les 24 heures. Après 72 heures de traitement, les puits étaient cultivés dans un milieu sans sérum de veau f<sup>o</sup> tal conformément aux expériences de Perez et coll. puisqu'il a été montré que le CFTR inh-172 pouvait se lier aux protéines plasmatiques [89].

Après 48 heures de privation de sérum de veau f<sup>o</sup> tal, les surnageants de culture cellulaire ont été récupérés et utilisés pour la mesure des concentrations de VEGF-A par ELISA. La mesure de concentration d'interleukine 8 par ELISA a également été effectuée afin de confirmer dans notre lignée cellulaire les effets du CFTR inh-172 sur la sécrétion d'interleukine 8 dans les travaux préalablement réalisés par Perez [89].

Le CFTR inh-172 était dilué dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) ( $0,02\text{mmol/mL}$  de milieu de culture). Afin de s'assurer de l'absence d'effet du DMSO sur la sécrétion de VEGF-A et d'interleukine 8 les mesures ont également été effectuées sur des cellules mises en présence de DMSO seul à cette même concentration dans le milieu de culture.

## Mesure des concentrations de VEGF-A par ELISA

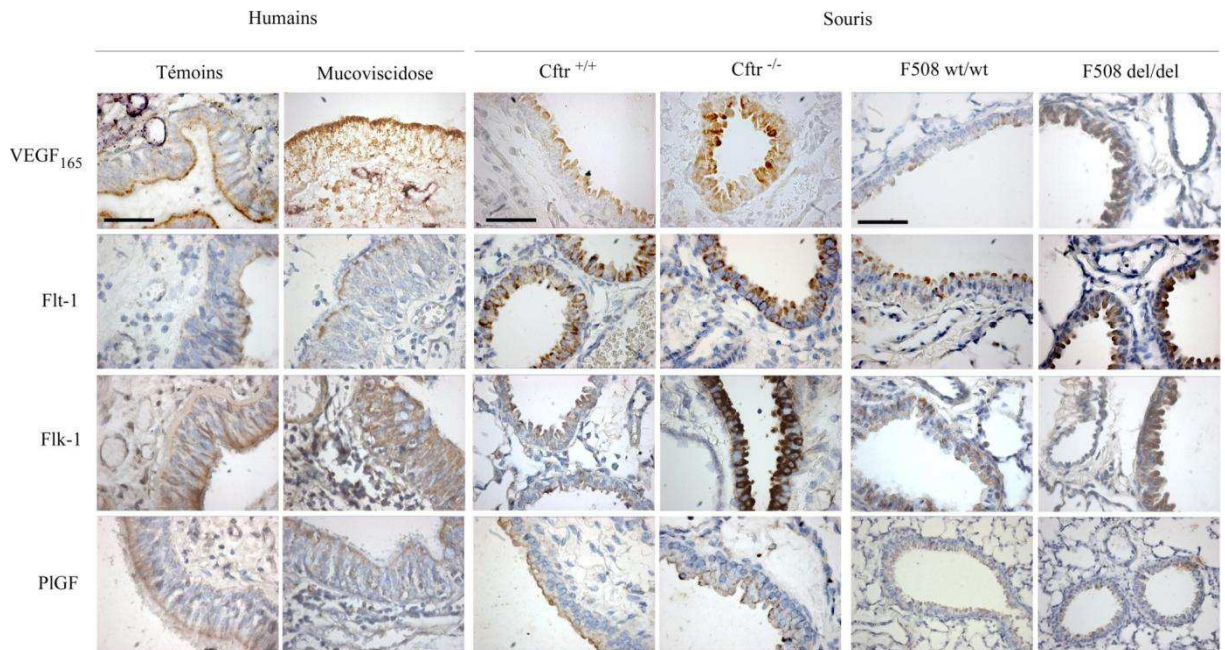
Nous avons mesuré par méthode ELISA les concentrations de la protéine VEGF-A et de l'interleukine 8 dans les surnageants de culture des cellules NCI-H292 à l'aide de kits ELISA commercialisés en suivant les recommandations du fabricant (Quantikine Human VEGF et Human CXCL8/IL-8 Duo Set, *R&D systems*, Lille, France). Les échantillons et les contrôles de concentrations connues ont été déposés de façon répliquée sur une plaque de 96 puits recouverte au préalable d'un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF-A (ou contre l'interleukine 8). Après incubation pendant 2 heures et rinçage avec une solution de PBS-Tween 0.05%, un anticorps polyclonal biotinylé anti VEGF-A (ou anti interleukine 8) a été déposé dans les puits pendant 2 heures. Après un nouveau rinçage avec une solution de PBS-Tween 0.05%, la streptavidine-HRP, qui se fixe à la biotine, a été déposée dans les puits de la plaque. Cette enzyme réagit avec un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine entraînant une réaction colorée proportionnelle à la quantité de la molécule d'intérêt (VEGF-A ou interleukine 8) détectée dans les puits. Cette réaction colorée a été arrêtée par l'ajout d'acide sulfurique. La plaque a ensuite été lue à une longueur d'ondes de 450 nm avec une correction des imperfections optiques de la plaque par soustraction des densités optiques obtenues par lecture à 570 nm à l'aide d'un lecteur de densité optique à double longueur d'ondes (Elx 808, ultra microplate reader, *Biotek instruments*). Les concentrations ont été obtenues par comparaison à une courbe de contrôles de concentrations connues et exprimées en pg/mL.

### **g. Statistiques**

Les résultats sont exprimés en médiane [25<sup>ème</sup>-75<sup>ème</sup> percentiles] pour les variables quantitatives et en valeur absolue (pourcentage) pour les valeurs qualitatives. Les variables quantitatives ont été comparées deux à deux avec un test non paramétrique de Mann-Whitney. Les variables qualitatives ont été comparées avec un test exact de Fisher ou par un test du Chi<sup>2</sup>. Une valeur de  $P < 0,05$  était considérée comme significative. L'analyse statistique a été réalisée avec le programme Graphpad Prism 4.03.

### 3. Résultats

#### a. Etude immunohistochimique de l'expression des facteurs angiogéniques et analyse morphométrique de la vascularisation péribronchique dans les tissus pulmonaires humains : comparaison entre les sujets Témoins et Mucoviscidosiques



#### Facteurs angiogéniques : voie de VEGF et de ses récepteurs

##### VEGF-A

L'étude en immunohistochimie des tissus pulmonaires humains a montré qu'il existe dans tous les prélèvements (groupe de Témoin et groupe Mucoviscidose) un marquage pour VEGF-A sur l'épithélium bronchique des voies aériennes proximales et distales associé à un faible marquage des structures épithéliales alvéolaires et des macrophages alvéolaires. VEGF-A n'a pas été retrouvé au niveau de l'endothélium vasculaire. Au niveau de l'épithélium bronchique, le marquage pour VEGF-A était granuleux, réparti sur toute la hauteur de la

cellule épithéliale mais prédominant à son pôle apical ; il était présent sur les cellules ciliées, les cellules de Clara et les cellules basales mais pas les cellules à mucus.

L'analyse morphométrique quantitative (Figure 2), exprimée en médiane [25<sup>ème</sup>-75<sup>ème</sup> percentiles], a montré une nette augmentation du pourcentage de la surface épithéliale bronchique exprimant le VEGF-A dans le groupe Mucoviscidose en comparaison avec le groupe de Témoin: respectivement 47 [33-60] % versus 27 [24-35] % ( $P= 0,006$ ).

### **Flt-1/VEGFR1**

L'immunomarquage pour Flt-1/VEGFR1 était faible sur l'épithélium bronchique humain alors qu'il n'existait pas de marquage endothélial visible. Il s'agissait également d'un marquage d'aspect granuleux intéressant tous les sous-types de cellules épithéliales bronchiques. L'analyse morphométrique de la surface épithéliale marquée pour Flt-1/VEGFR1 n'a retrouvé aucune différence significative entre les sujets Témoins et les sujets Mucoviscidosiques ( $P= 0,12$ ) (Figure 2).

### **Flk-1/VEGFR2**

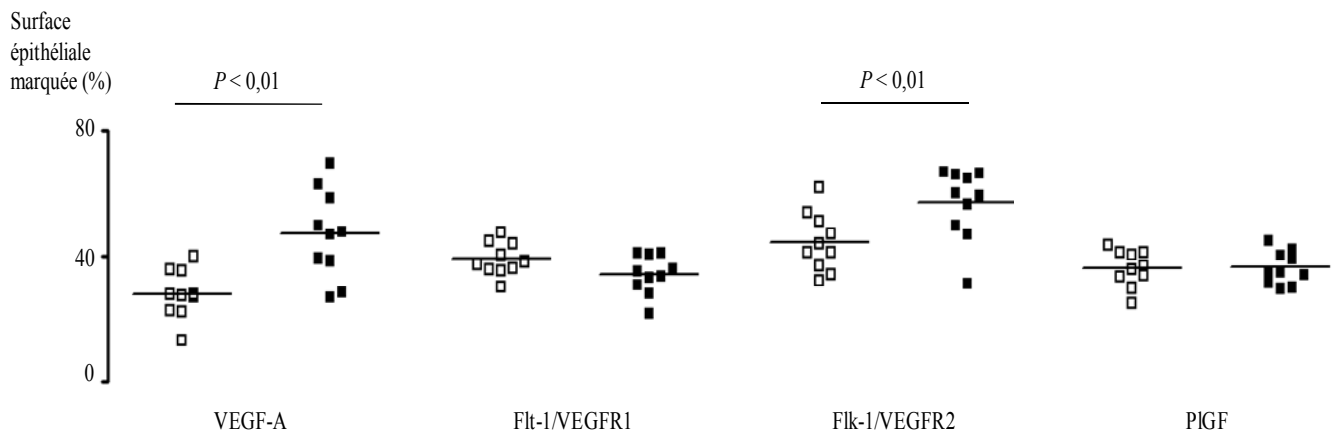
L'immunomarquage pour Flk-1/VEGFR2 a montré une expression intense dans l'épithélium bronchique avec une expression par toutes les cellules épithéliales. On retrouvait également un marquage intense des structures vasculaires de gros calibre ainsi qu'un immunomarquage plus faible des vaisseaux péribronchiques de petit calibre. Ce marquage épithélial et endothélial était plus intense chez les sujets Mucoviscidosiques. Enfin, nous avons noté un marquage faible des structures épithéliales alvéolaires et des cellules inflammatoires intraalvéolaires. Comme l'illustre la Figure 2, la surface épithéliale marquée



pour Flk-1/VEGFR2 était significativement plus faible chez les sujets Témoins que chez les sujets Mucoviscidosiques (42 [35-51] % versus 59 [48-66] %, respectivement ;  $P= 0,02$ ). L'analyse quantitative de l'expression de Flk-1/VEGFR2 dans l'endothélium des sujets Témoins et Mucoviscidosiques est en cours.

## PIGF

Comme illustré sur la figure 2, nous avons observé une expression de PIGF au niveau de l'épithélium bronchique, localisée principalement à l'apex des cellules épithéliales, de façon identique chez les sujets Témoins et Mucoviscidosiques. Nous n'avons pas noté d'immunomarquage pour PIGF dans l'endothélium vasculaire, l'épithélium alvéolaire et les cellules inflammatoires intraalvéolaires. L'analyse morphométrique quantitative du marquage épithélial pour PIGF n'a pas montré de différence significative entre les groupes de Témoin et de Mucoviscidose ( $P= 0,9$ ).



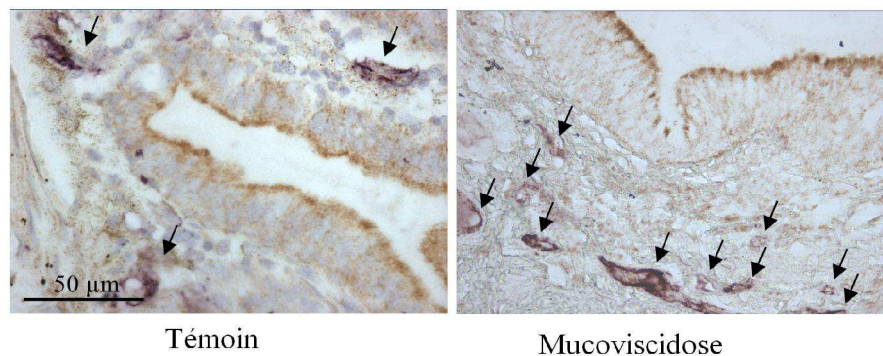
**Figure 2:** Analyse morphométrique quantitative de l'immunomarquage épithélial pour les facteurs angiogéniques (VEGF-A, PIGF) et leur récepteurs (VEGFR1/Flt-1, VEGFR2/Flk-1) dans les tissus pulmonaires des sujets Témoins (carrés blanc) et des sujets Mucoviscidosiques (carrés noirs). La surface épithéliale marquée est exprimée en pourcentage de la surface épithéliale totale. Chaque carré représente la donnée obtenue chez un patient et les barres horizontales représentent les médianes.

## Vascularisation péribronchique dans les voies respiratoires des sujets Témoins et Mucoviscidosiques

Tel que le montre la figure 3, l'analyse morphométrique quantitative de la vascularisation péribronchique identifiée par l'expression du facteur von Willebrand (un marqueur endothélial) a montré que les sujets Témoins présentaient une surface vasculaire et un nombre de vaisseaux plus faibles que les sujets Mucoviscidosiques, notamment en ce qui concerne les petits et moyens vaisseaux ( $P < 0,05$ ).

**Figure 3:** Vascularisation péribronchique de petite ( $<15\mu\text{m}$ ), moyenne (15 à  $35\mu\text{m}$ ) et grande taille ( $>35\mu\text{m}$ ) chez les sujets Témoins et les sujets Mucoviscidosiques.

**Figure 3A.**



**Figure 3B.**

		Témoins	Mucoviscidose
Surface vasculaire / Surface périfonchique (%)		4,1 [6,7-10,5]	15,3 [9,6-17,1]*
Surface Vasculaire (mm <sup>2</sup> ) / Longueur membrane basale (mm) (10 <sup>-3</sup> )		6,5 [5,3-12,1]	36,45 [23,6-41,9]*
Nombre vaisseaux/ Surface périfonchique (mm <sup>2</sup> )	Gros (> 35µm)	0,6 [0,3-1,3]	1,4 [0,7-4,9]
	Moyens (15 à 35 µm)	29,9 [18,2-78,3]	57,5 [35,7-71,4]
	Petits (< 15µm)	67,4 [56,8-123,7]	144,3 [118,7-209,4]*
	Totaux	129,3 [97,1-195,1]	215,7 [168,9-289]*
Nombre vaisseaux/ Longueur membrane basale (mm)	Gros (> 35µm)	5,1 [3,3-15,3]	6,1 [2,7-21,2]
	Moyens (15 à 35 µm)	3,8 [2,1-6,6]	14,4 [8,8-17,3]*
	Petits (< 15µm)	9,1 [5,4-13,2]	34,7 [28,8-52,2]*
	Totaux	15,3 [11,2-19,2]	53,4 [42,8-67,2]*

**Légende :** **A** : Microphotographies représentatives de l'immunomarquage (en violet) par le facteur von Willebrand de la vascularisation périfonchique (grossissement 400x) et pour VEGF-A (en marron) chez un sujet mucoviscidosique. **B** : Analyse morphométrique quantitative de la vascularisation périfonchique. Les résultats sont exprimés en médiane [25<sup>ème</sup> - 75<sup>ème</sup> percentiles] (\* :  $P < 0,01$  entre sujets Témoins et Mucoviscidosiques).

## **b. Etude du rôle de *cftr* dans l'expression des facteurs angiogéniques et de leurs récepteurs dans l'angiogenèse péribronchique**

Etude in vivo de l'expression des facteurs angiogéniques et de la vascularisation au sein de tissus pulmonaires murins : comparaison entre souris sauvages et souris déficientes pour *cftr*

### **Expression histologique des facteurs angiogéniques dans les voies respiratoires des souris sauvages et des souris déficientes pour *cftr*.**

#### **VEGF-A**

Chez la souris, le marquage de VEGF-A était localisé principalement au niveau de l'épithélium bronchique : ce marquage prédominait à l'apex de la cellule épithéliale bronchique, prenait le même aspect granuleux et était plus intense chez les souris mutées pour *cftr*. Nous avons noté par ailleurs un marquage des cellules inflammatoires intraalvéolaires, probablement macrophagiques, et un marquage de certaines cellules épithéliales alvéolaires. Il n'y avait pas non plus chez la souris de marquage visible au niveau des structures endothéliales vasculaires. Comme indiqué sur la figure 4, la surface épithéliale marquée par l'anticorps dirigé contre VEGF-A était plus importante chez les souris *Cftr*  $-/-$  que chez les souris *Cftr*  $+/+$  : 55 [50-60] % de la surface épithéliale totale versus 38 [36-47] % ( $P= 0,007$ ). De même, la surface épithéliale marquée pour VEGF-A était significativement plus importante chez les souris *F508 del/del* : 76 [65-79] % que les chez les souris *F508 wt/wt* : 44 [37-46] % ( $P = 0,008$ ).

## **Flt-1/VEGFR1**

Il existait un immunomarquage modéré pour Flt-1/VEGFR1 au niveau de certaines cellules de l'épithélium bronchique, sur toute la hauteur de la cellule épithéliale et d'aspect granuleux, sans différence notable entre les souris sauvages et les souris mutées pour *cfr*. Ce marquage intéressait à la fois les cellules ciliées et les cellules sécrétrices. On ne note pas d'immunomarquage pour Flt-1/VEGFR1 au niveau de l'endothélium vasculaire ni aux niveaux des structures cellulaires alvéolaires. Il existait une augmentation non significative du pourcentage de surface épithéliale marquée pour Flt-1 dans le groupe de souris *Cfr* *-/-* : 57 [46-65] % en comparaison avec le groupe de souris *Cfr* *+/+* : 49 [47-52] % ( $P = 0,9$ ) alors que cette augmentation était modeste mais significative pour le groupe de souris *F508 del/del* : 53 [40-55] % en comparaison avec les souris *F508 wt/wt* : 39 [36-42] % ( $P = 0,03$ )(figure 4).

## **Flk-1/VEGFR2**

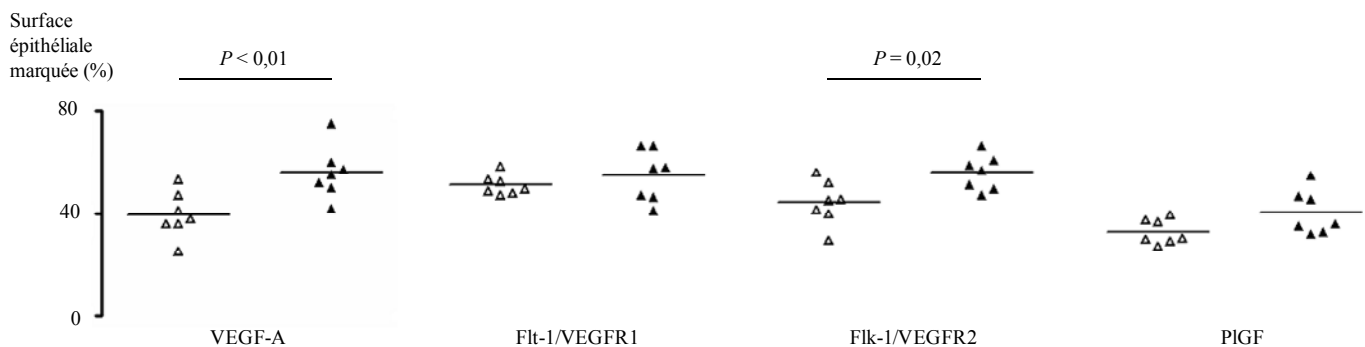
Il existait un immunomarquage intense des différentes cellules de l'épithélium bronchique murin, intéressant tout le cytoplasme, plus marqué chez les souris mutées pour *cfr*. Il n'y avait pas de marquage des structures endothéliales vasculaires. La surface épithéliale marquée pour Flk-1/VEGFR2 était significativement plus élevée dans le groupe de souris *Cfr* *-/-* : 56 [49-60] % que dans le groupe de souris *Cfr* *+/+* : 45[39-52] % ( $P = 0,02$ ). De même, chez les souris *F508 del/del*, l'immunomarquage épithélial était plus important que chez les souris *F508 wt/wt* : 70 [66-80] % versus 47 [44-59] % ( $P < 0,01$ ) (figure 4).

## PlGF

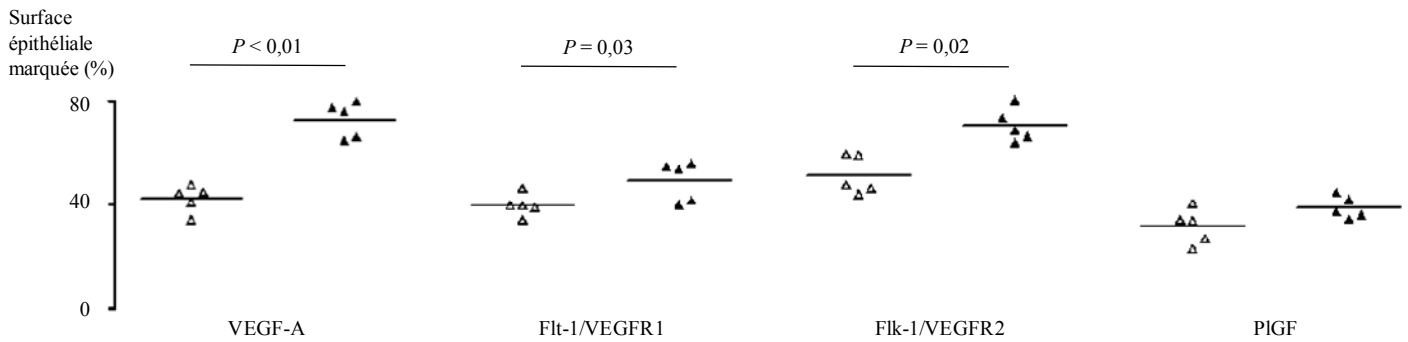
PlGF était principalement exprimé au niveau de l'épithélium bronchique, de façon identique chez les souris sauvages et les souris mutées pour *cflr*. Nous n'avons pas noté d'immunomarquage pour PlGF au niveau de l'endothélium vasculaire ni au niveau de l'épithélium alvéolaire et des cellules inflammatoires intraalvéolaires. L'analyse quantitative du pourcentage de surface épithéliale marquée par le PlGF n'a pas montré pas de différence significative entre les souris *Cflr* +/- et *Cflr* -/- : 29 [28-36] % versus 32 [32-46] % ( $P=0,12$ ). De même, il n'existait pas de différence significative de pourcentage de surface épithéliale marquée par le PlGF entre les souris *F508 wt/wt* et *F508 del/del* : respectivement 34 [25-38] % versus 38 [36-44] % ( $P=0,06$ ).

**Figure 4: Analyse morphométrique quantitative de l'immunomarquage épithélial pour les facteurs angiogéniques (VEGF-A, PlGF) et leurs récepteurs (Flt-1/VEGFR1, Flk-1/VEGFR2) dans les tissus pulmonaires murins.**

**Figure 4A**



**Figure 4B**



**Légende :** La surface épithéliale marquée est exprimée en pourcentage de la surface épithéliale totale. Chaque triangle représente la donnée obtenue chez une souris et les barres horizontales représentent les médianes.

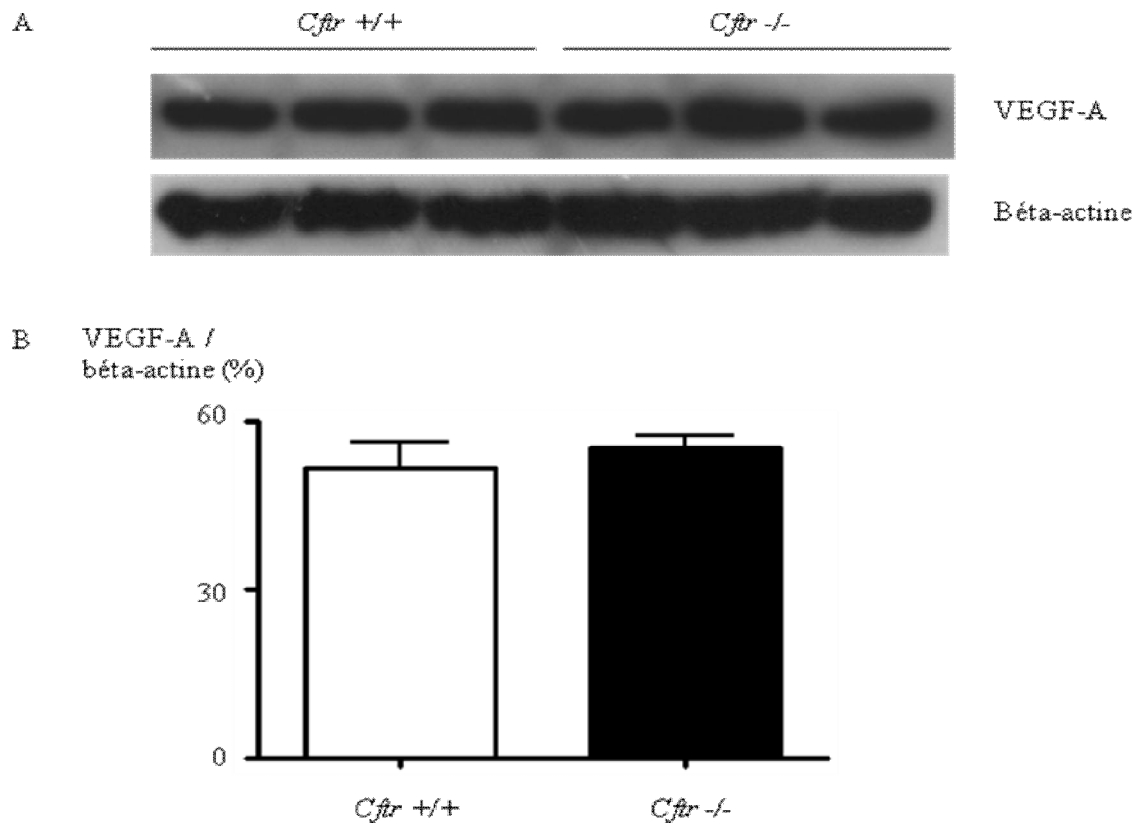
A : Comparaison des souris *Cftr*<sup>+/+</sup> (triangles blancs) et *Cftr*<sup>-/-</sup> (triangles noirs).

B : Comparaison des souris *F508* *wt/wt* (triangles blancs) et *F508* *del/del* (triangles noirs).

**Analyse semi-quantitative par Western Blot de la protéine VEGF-A dans les tissus pulmonaires des souris *Cftr*<sup>+/+</sup> et *Cftr*<sup>-/-</sup>**

En Western Blot, les intensités de signal pour VEGF-A mesurées dans les homogénats de tissus pulmonaires rapportées à celles de la bêta-actine n'étaient pas significativement différentes entre les souris *Cftr*<sup>+/+</sup> et *Cftr*<sup>-/-</sup> ( $P = 0,23$ ) (figure 5).

**Figure 5: Analyse par Western Blot de la concentration de VEGF-A et de bêta-actine dans les homogénats pulmonaires de souris *Cftr*<sup>+/+</sup> (n= 13) et *Cftr*<sup>-/-</sup>(n= 10).**



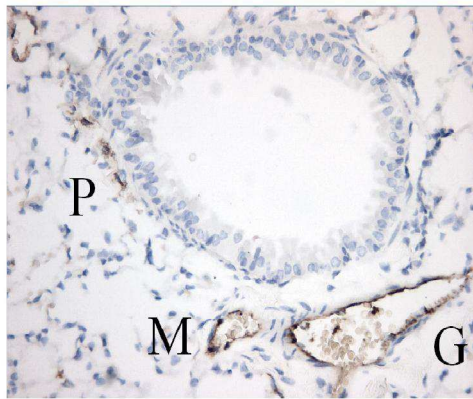
**Légende :** A : Photographie représentative des films obtenus en Western Blot pour VEGF-A et la bêta-actine dans les homogénats pulmonaires de souris *Cftr*<sup>+/+</sup> et *Cftr*<sup>-/-</sup>. Chaque puits représente l'homogénat pulmonaire d'une souris. B : Quantification de la concentration de VEGF-A exprimée en ratio intensité du signal pour VEGF-A/ intensité du signal pour la bêta-actine x 100 représentant les moyennes sur n= 13 souris *Cftr*<sup>+/+</sup> et n= 10 souris *Cftr*<sup>-/-</sup>. Les barres d'erreur représentent les écarts types.



**Vascularisation péribronchique dans les voies respiratoires des souris sauvages et des souris déficientes pour *cftr***

L'analyse quantitative de la vascularisation péribronchique n'a pas retrouvé de différence significative entre les souris sauvages et les souris déficientes pour *cftr* (figure 6), que ce soit en termes de surface vasculaire ou de nombre de vaisseaux.

**Figure 6A**



**Figure 6B (Tableau)**

		Cftr +/+	Cftr -/-	F508 wt/wt	F508 del/del
Surface vasculaire / Surface pérbronchique (%)		26 [23-54]	25 [20-31]	29 [16-30]	29 [26-36]
Surface Vasculaire (mm <sup>2</sup> ) / Longueur membrane basale (mm) (10 <sup>-3</sup> )		9 [7-20]	9 [7-20]	9 [2,5-11]	8 [7,5-8,5]
Nombre vaisseaux / Surface pérbronchique (mm <sup>2</sup> )	Gros (> 35µm)	38 [20-57]	32 [18-38]	24 [20-32,1]	31 [27-40]
	Moyens (15 à 35 µm)	38 [29-63]	58 [40-61]	44 [34-89]	45 [32-64]
	Petits (< 15µm)	117 [79-125]	96,4 [74-108]	102 [32-114]	42 [32-76]
	Totaux	175 [146-230]	168 [165-203]	181 [93-224]	120,0 [108-164]
Nombre vaisseaux / Longueur membrane basale (mm)	Gros (> 35µm)	1,2 [0,9-2,1]	1,0 [0,7-1,8]	0,8 [0,5-1,0]	0,8 [0,7-1,1]
	Moyens (15 à 35 µm)	1,4 [1,1-1,8]	1,7 [1,5-2,1]	1,5 [1,2-1,9]	1,2 [1,0-1,5]
	Petits (< 15µm)	3,3 [3,0-5,4]	2,8 [2,4-4 ,3]	2,3 [1,1-3,4]	1,3 [0,8-2,0]
	Totaux	6,4 [6,1-6,9]	5,9 [5,4-6,9]	4,3 [3,1-6,2]	3,4 [2,9-4,2]

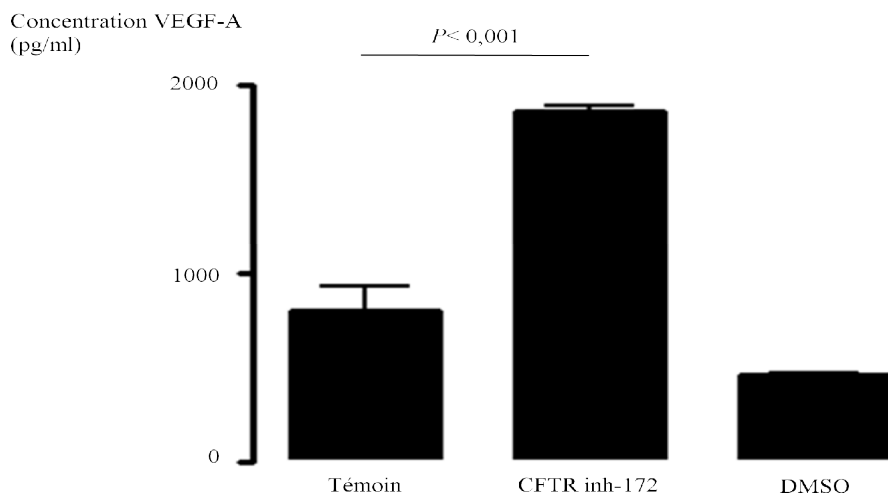
**Figure 6: Vascularisation pérbronchique de petite (<15µm), moyenne (15 à 35µm) et grande taille (>35µm) chez les souris sauvages et les souris déficientes pour *cftr*.**

A : Microphotographies représentatives de l'immunomarquage par le facteur von Willebrand (en violet) de la vascularisation pérbronchique de petit (P), moyen (M) et gros (G) calibre (grossissement initial 400x).

B : Analyse morphométrique quantitative de la vascularisation pérbronchique. Les résultats sont exprimés en médiane [25<sup>ème</sup> -75<sup>ème</sup> percentiles]. Il n'y avait pas de différence significative entre souris *Cftr* +/+ et *Cftr* -/- ni entre souris *F508 wt/wt* et *F508 del/del*.

**Etude in vitro: effet d'un inhibiteur de CFTR (CFTR inh-172) sur la synthèse de VEGF-A par les cellules épithéliales respiratoires NCI-H292**

Les cellules NCI-H292 expriment VEGF-A et un CFTR fonctionnel à l'état basal (voir Méthodes). Après le traitement de ces cellules pendant 72h par le CFTR inh-172, une molécule inhibant les transports ioniques CFTR dépendant [88], les concentrations de VEGF-A dans le surnageant de culture cellulaire étaient de  $1854 \pm 65$  pg/ml en comparaison avec les cellules contrôles :  $802 \pm 243$  pg/ml ( $P < 0,001$  ;  $n=4$  expériences indépendantes). Le CFTR inh-172 ayant été dilué dans du DMSO, nous avons également mesuré la concentration de VEGF-A dans les surnageants de cellules cultivées en présence de DMSO et celle-ci n'était pas significativement différente de celle des cellules contrôles (figure 7).



**Figure 7: Quantification par ELISA de la concentration de VEGF-A dans le surnageant des cellules NCI-H292 cultivées avec le milieu de culture seul (Témoin), le milieu de culture additionné de CFTR inh-172 (20 $\mu$ M) dilué dans du DMSO (CFTR inh-172) ou le milieu de culture additionné de DMSO (DMSO). Les résultats sont exprimés en pg/ml et représentent les moyennes sur  $n=4$  expériences. Les barres d'erreur représentent les écarts types.**

#### 4. Discussion

Nos résultats indiquent que les modifications structurales de la circulation bronchique chez les patients atteints de mucoviscidose évoluée sont caractérisées par une hypervascularisation péribronchique développée principalement aux dépens des vaisseaux de petite taille. Cette hypervascularisation péribronchique est associée à surexpression de VEGF-A par l'épithélium respiratoire, qui pourrait être favorisée par la dysfonction de CFTR comme le suggèrent nos données chez l'animal et sur des cultures de cellules épithéliales humaines. Ces données suggèrent que la mucoviscidose est caractérisée intrinsèquement par un phénotype épithélial favorisant l'angiogenèse péribronchique.

L'étude immunohistochimique des tissus pulmonaires humains a révélé que les patients Mucoviscidosiques ont une synthèse de VEGF-A par l'épithélium respiratoire augmentée par rapport aux sujets Témoins. Ces résultats sont en accord avec les données de Krenn et coll. [35] qui ont comparé 22 patients Mucoviscidosiques au stade de la greffe, 25 patients greffés pour insuffisance respiratoire chronique terminale sur broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) post-tabagique et 12 sujets contrôles (patients non-fumeurs opérés pour pneumothorax). Ces auteurs ont retrouvé une augmentation de l'expression de l'ARNm (RT-PCR) et de la protéine VEGF (Western blot) dans les broyats pulmonaires. De plus, nos données indiquent que l'épithélium respiratoire est un site majeur d'expression de VEGF dans les poumons des patients mucoviscidosiques au stade de la greffe.

L'étude de deux modèles murins mutés pour le gène *cftr* a montré que la dysfonction de CFTR est associée à une surexpression de VEGF-A par l'épithélium respiratoire. Ces données prolongent les travaux de Verhaeghe et coll. qui avaient montré que les cellules épithéliales trachéales CFT-2 (ayant une mutation homozygote de *CFTR* de type F508del) en culture présentent une synthèse accrue de VEGF-A, mesurée par ELISA et RT-PCR, par

rapport à des cellules épithéliales trachéales NT-1 non mutées pour CFTR [38]. Nos expériences d'inhibition des transports ioniques dépendant de CFTR par l'inh-172 [88] sur des cellules épithéliales tumorales exprimant un CFTR fonctionnel suggèrent que la synthèse de VEGF est modulée par les anomalies de transport ioniques liées à la dysfonction de CFTR plutôt que par une interaction entre CFTR et VEGF.

L'hypervascularisation péribronchique chez les patients Mucoviscidosiques adultes au stade de la greffe est caractérisée par une augmentation du nombre des vaisseaux de petit calibre. Cette hypervascularisation n'a pas été retrouvée chez les souris déficientes pour *cftr* (*Cftr* *-/-* et *F508 del/del*) comparées aux souris sauvages, malgré l'expression plus élevée de VEGF dans l'épithélium des souris mutées pour *cftr*. Les raisons possibles de cette discordance entre les données humaines et murines sont les suivantes : (1) l'âge relativement jeune (8 à 10 semaines) des souris qui n'auraient pas eu le temps de développer de nouveaux vaisseaux sous l'action du VEGF épithélial. Cette explication est peu probable car Baluk et coll. ont montré que la surexpression épithéliale de VEGF chez la souris provoquait un doublement de la densité vasculaire trachéale en seulement 7 jours [10] (2) dans notre étude nous avons examiné pour la première fois dans le contexte de la mucoviscidose l'expression de VEGFR2, le récepteur qui joue un rôle clé dans la transduction du signal pro-angiogénique de VEGF-A. Nos données indiquent une expression de VEGFR2 au niveau de l'endothélium vasculaire des prélèvements pulmonaires humains alors que ce récepteur n'était que peu exprimé dans l'endothélium vasculaire chez les souris déficientes pour *cftr*. Nous suggérons que l'angiogenèse péribronchique soit déclenchée par l'interaction VEGF épithélial/VEGFR2 endothélial chez les patients mucoviscidosiques. Chez la souris mutée pour *cftr*, l'expression de VEGF sans expression de VEGFR2 ne suffirait pas à déclencher l'angiogenèse péribronchique. Ce phénomène pourrait nécessiter un stimulus exogène, par exemple l'hypoxie [85] ou l'infection bactérienne (Clémence Martin, *Eur Resp J* 2010, en révision);

cette possibilité nécessitera la réalisation d'études ultérieures. (3) enfin, il est possible que des facteurs non étudiés dans ce travail participent à l'angiogenèse. Ainsi d'autres facteurs de croissance (par exemple, le bêta FGF) pourraient être importants dans l'angiogenèse péribronchique de la mucoviscidose. Là encore, des études complémentaires seront nécessaires.

De façon surprenante, nous avons trouvé que VEGFR2 est fortement exprimé par l'épithélium respiratoire, et ceci de façon plus importante chez les sujets Mucoviscidosiques ainsi que chez les souris déficientes pour *cftr*. VEGFR2 était également exprimé dans l'épithélium respiratoire des patients atteints de BPCO [34]. Ces données suggèrent que la voie VEGF-A/VEGFR2 est impliquée dans la prolifération de l'épithélium respiratoire, comme proposé par les travaux de Lee et coll. [92] où l'inhibition de VEGF-A a induit un blocage de la prolifération de l'épithélium de polypes naso-sinusiens en culture. Ceci pourrait contribuer à l'hypertrophie épithéliale respiratoire observée dans la mucoviscidose [93].

A contrario, l'expression endothéliale de VEGFR1 et de PlGF est faible dans notre étude à la fois chez l'homme et chez la souris. De plus, leur expression épithéliale diffère peu entre sujets Témoins et Mucoviscidosiques ainsi qu'entre souris sauvages et déficientes pour *cftr*. Ces constatations ne sont pas en faveur d'un rôle majeur de ces molécules dans l'angiogenèse péribronchique et la prolifération épithéliale au cours de la mucoviscidose.

Notre étude comporte un certain nombre de qualités. Les données sur la surexpression de VEGF dans l'épithélium mucoviscidosique, ont été confirmées sur nos trois types de préparations : prélèvements pulmonaires de patients mucoviscidosiques, souris transgéniques de 2 souches différentes par comparaison à leurs lignées contrôles et cellules épithéliales respiratoires en culture. L'étude immunohistochimique apporte une valeur localisatrice essentielle et les données quantitatives reposent sur des techniques d'analyse morphométrique

bien établies [67]. Nous reconnaissons également certaines faiblesses. L'augmentation de VEGF-A chez les souris déficientes pour *cfr* n'a pas été retrouvée en Western Blot sur les broyats pulmonaires, probablement du fait qu'il s'agit d'un phénomène localisé à l'épithélium respiratoire pesant peu dans l'analyse de l'ensemble d'un broyat pulmonaire. De plus, la souris déficiente pour *cfr* n'a pas une atteinte pulmonaire comparable à celle de la mucoviscidose humaine [94] et il serait intéressant de pouvoir confirmer les données obtenues chez la souris sur un modèle animal de mucoviscidose présentant une atteinte respiratoire plus proche de la pathologie humaine, par exemple le mini-porc [95]. De la même façon, il serait intéressant de réaliser l'étude in vitro de l'inhibition de CFTR sur la production de VEGF-A par des cellules épithéliales respiratoires non tumorales.

Enfin, il reste à déterminer par de futurs travaux le mécanisme d'interaction de CFTR avec la voie VEGF/VEGFR, le défaut de transport ionique induit par la dysfonction de CFTR semblant entrer en jeu puisque l'inhibiteur chimique CFTR inh-172 induit une production épithéliale accrue de VEGF-A. Outre la compréhension du rôle de CFTR, c'est l'implication d'autres facteurs pouvant intervenir dans l'angiogenèse bronchique de ces patients Mucoviscidosiques qu'il sera important d'établir: infection, inflammation, hypoxie. Des travaux étudiant l'impact de la déficience de *cfr* (souris KO) sur l'angiogenèse péribronchique induite par l'infection bactérienne sont en cours au laboratoire.

En conclusion, nous avons établi qu'il existe une surexpression de VEGF-A par l'épithélium respiratoire associée à l'hypervascularisation bronchique chez les patients mucoviscidosiques au stade de la greffe pulmonaire. Chez la souris, la dysfonction de *cfr* induit une surexpression de VEGF-A dans l'épithélium respiratoire mais n'est pas suffisante pour provoquer une hypervascularisation. Nos données suggèrent que des facteurs autres que la dysfonction de CFTR (par exemple, l'infection bronchique et l'hypoxie tissulaire) sont nécessaires pour provoquer l'angiogenèse péribronchique chez les patients

mucoviscidosiques. VEGFR2 pourrait être important non seulement dans l'angiogenèse bronchique mais aussi dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium respiratoire chez les sujets mucoviscidosiques.



**DISCUSSION GENERALE**

**ET**

**PERSPECTIVES IMMEDIATES**

Nos travaux ont porté sur les mécanismes de l'angiogénèse des vaisseaux bronchiques et bronchiolaires dans le contexte des dilatations des bronches et de la mucoviscidose. Nos données indiquent que l'infection bactérienne, en particulier par *P. aeruginosa* qui est un pathogène important dans ce contexte, provoque l'angiogénèse des vaisseaux bronchiques chez la souris. L'augmentation de l'expression épithéliale de VEGF en réponse à l'infection bactérienne suggère un rôle pour VEGF et ses récepteurs dans l'angiogénèse bronchique induite par *P. aeruginosa* mais la confirmation de ce rôle nécessitera la réalisation d'études avec des inhibiteurs sélectifs de l'axe VEGF/VEGFR.

La pertinence de ces travaux est confortée par nos données histopathologiques qui montrent une association entre l'expression augmentée de VEGF par l'épithélium bronchiolaire et une hypervascularisation péribronchiolaire chez les patients atteints de mucoviscidose au stade de la greffe pulmonaire. Nos études in vitro et sur les souris mutées pour le gène *cfr* indiquent que l'expression épithéliale de VEGF est augmentée lorsque *cfr* est non fonctionnel. Cependant, la surexpression de VEGF induite par la perte de fonction de *cfr* ne semble pas suffisante à provoquer une angiogénèse des vaisseaux bronchiques. Nous prévoyons d'étudier de transposer notre modèle de billes d'agarose contenant *Pseudomonas aeruginosa* aux souris mutées pour *cfr*. L'objectif est d'explorer l'hypothèse que les souris déficientes pour *cfr* ont une angiogénèse péribronchique différentes (intensité de la réponse, anomalies morphologiques ou fonctionnelles des vaisseaux) de celle des souris sauvages.

Notre modèle pourra être utilisé pour disséquer d'autres aspects des mécanismes de l'angiogénèse péribronchique induite par l'infection. En particulier, le rôle des cellules inflammatoires (macrophages, neutrophiles, lymphocytes) qui produisent de nombreux médiateurs pro-angiogéniques (CXCL-8 ou son équivalent murin, HGF, beta FGF ) devra être étudié.

Ce modèle d'infection chronique d'origine bronchique a par ailleurs de nombreuses applications possibles. Une de ces applications concerne le devenir des cellules inflammatoires recrutées dans les bronches lors de l'infection : en collaboration avec le groupe de Véronique Witko-Sarsat (Institut Cochin), nous étudions actuellement les mécanismes de la survie des polynucléaires neutrophiles dans les bronches dans ce contexte d'infection prolongée.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Pasteur MC, Bilton D, Hill AT. British Thoracic Society guideline for non-CF bronchiectasis. *Thorax* 2010; 65 Suppl 1:i1-58.
2. Cystic Fibrosis Foundation. Cystic fibrosis foundation patient registry annual data report to the center directors. 2008.
3. Chmiel JF, Davis PB. State of the art: why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir Res* 2003; 4:8.
4. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellon G, Berger J, Weiss T, Botzenhart K, Yankaskas JR, Randell S, Boucher RC, Doring G. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 2002; 109:317-25.
5. Flume PA, Mogayzel Jr PJ, Robinson KA, Rosenblatt RL, Quittell L, Marshall BC, Clinical Practice Guidelines For Pulmonary Therapies C. Cystic Fibrosis Pulmonary Guidelines: Pulmonary Complications: Hemoptysis and Pneumothorax. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; in press.
6. McCullagh A, Rosenthal M, Wanner A, Hurtado A, Padley S, Bush A. The bronchial circulation--worth a closer look: a review of the relationship between the bronchial vasculature and airway inflammation. *Pediatr Pulmonol* 2010; 45:1-13.
7. Paredi P, Barnes PJ. The airway vasculature: recent advances and clinical implications. *Thorax* 2009; 64:444-50.
8. Ravnicek DJ, Konecny MA, Pratt JP, Wolloscheck T, Huss HT, Mentzer SJ. The murine bronchopulmonary microcirculation in hapten-induced inflammation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 133:97-103.
9. Mitzner W, Lee W, Georgakopoulos D, Wagner E. Angiogenesis in the mouse lung. *Am J Pathol* 2000; 157:93-101.
10. Baluk P, Lee CG, Link H, Ator E, Haskell A, Elias JA, McDonald DM. Regulated angiogenesis and vascular regression in mice overexpressing vascular endothelial growth factor in airways. *Am J Pathol* 2004; 165:1071-85.
11. Lee CG, Link H, Baluk P, Homer RJ, Chapoval S, Bhandari V, Kang MJ, Cohn L, Kim YK, McDonald DM, Elias JA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat Med* 2004; 10:1095-103.
12. Danese S, Dejana E, Fiocchi C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J Immunol* 2007; 178:6017-22.

13. Frantz S, Vincent KA, Feron O, Kelly RA. Innate immunity and angiogenesis. *Circ Res* 2005; 96:15-26.
14. Charan NB, Baile EM, Pare PD. Bronchial vascular congestion and angiogenesis. *Eur Respir J* 1997; 10:1173-80.
15. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9:653-60.
16. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005; 438:967-74.
17. Mitzner W, Wagner EM. Vascular remodeling in the circulations of the lung. *J Appl Physiol* 2004; 97:1999-2004.
18. Thurston G, Murphy TJ, Baluk P, Lindsey JR, McDonald DM. Angiogenesis in mice with chronic airway inflammation: strain-dependent differences. *Am J Pathol* 1998; 153:1099-112.
19. Lee CG, Yoon HJ, Zhu Z, Link H, Wang Z, Gwaltney JM, Landry M, Elias JA. Respiratory syncytial virus stimulation of vascular endothelial cell growth Factor/Vascular permeability factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23:662-9.
20. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161:851-8.
21. Dvorak HF. Discovery of vascular permeability factor (VPF). *Exp Cell Res* 2006; 312:522-6.
22. Dvorak HF, Orenstein NS, Carvalho AC, Churchill WH, Dvorak AM, Galli SJ, Feder J, Bitzer AM, Rypysc J, Giovinco P. Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor-secreted products. *J Immunol* 1979; 122:166-74.
23. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005; 65:550-63.
24. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280:C1358-66.
25. Dunnill MS. The pathology of asthma, with special reference to changes in the bronchial mucosa. *J Clin Pathol* 1960; 13:27-33.
26. Salvato G. Some histological changes in chronic bronchitis and asthma. *Thorax* 1968; 23:168-72.
27. Salvato G. Quantitative and morphological analysis of the vascular bed in bronchial biopsy specimens from asthmatic and non-asthmatic subjects. *Thorax* 2001; 56:902-6.

28. Feltis BN, Wignarajah D, Zheng L, Ward C, Reid D, Harding R, Walters EH. Increased vascular endothelial growth factor and receptors: relationship to angiogenesis in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:1201-7.
29. Walters EH, Reid D, Soltani A, Ward C. Angiogenesis: a potentially critical part of remodelling in chronic airway diseases? *Pharmacol Ther* 2008; 118:128-37.
30. Hoshino M, Takahashi M, Aoike N. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:295-301.
31. Kasahara Y, Tuder RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:737-44.
32. Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest* 2000; 106:1311-9.
33. Hashimoto M, Tanaka H, Abe S. Quantitative analysis of bronchial wall vascularity in the medium and small airways of patients with asthma and COPD. *Chest* 2005; 127:965-72.
34. Kranenburg AR, de Boer WI, Alagappan VK, Sterk PJ, Sharma HS. Enhanced bronchial expression of vascular endothelial growth factor and receptors (Flk-1 and Flt-1) in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2005; 60:106-13.
35. Krenn K, Klepetko W, Taghavi S, Paulus P, Aharinejad S. Vascular endothelial growth factor increases pulmonary vascular permeability in cystic fibrosis patients undergoing lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007; 32:35-41.
36. McColley SA, Stellmach V, Boas SR, Jain M, Crawford SE. Serum vascular endothelial growth factor is elevated in cystic fibrosis and decreases with treatment of acute pulmonary exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1877-80.
37. Kahler CM, Prior C, Gunsilius E. Serum vascular endothelial growth factor is elevated in cystic fibrosis and decreases with treatment of acute pulmonary exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1030-1.
38. Verhaeghe C, Tabruyn SP, Oury C, Bours V, Griffioen AW. Intrinsic pro-angiogenic status of cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356:745-9.
39. Plotkowski MC, Chevillard M, Pierrot D, Altemayer D, Zahm JM, Colliot G, Puchelle E. Differential adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human respiratory epithelial cells in primary culture. *J Clin Invest* 1991; 87:2018-28.

40. Burgel PR, Nadel JA. Epidermal growth factor receptor-mediated innate immune responses and their roles in airway diseases. *Eur Respir J* 2008; 32:1068-81.
41. Burgel PR, Nadel JA. Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium. *Thorax* 2004; 59:992-6.
42. Shao MX, Ueki IF, Nadel JA. Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme mediates MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:11618-23.
43. Shao MX, Nadel JA. Neutrophil elastase induces MUC5AC mucin production in human airway epithelial cells via a cascade involving protein kinase C, reactive oxygen species, and TNF-alpha-converting enzyme. *J Immunol* 2005; 175:4009-16.
44. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285:1182-6.
45. Levitzki A, A. G. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 1995; 267:1782.
46. Perrotte P, Matsumoto T, Inoue K, Kuniyasu H, Eve BY, Hicklin DJ, Radinsky R, Dinney CP. Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* 1999; 5:257-65.
47. Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, Kerbel RS. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 1997; 151:1523-30.
48. Ravindranath N, Wion D, Brachet P, Djakiew D. Epidermal growth factor modulates the expression of vascular endothelial growth factor in the human prostate. *J Androl* 2001; 22:432-43.
49. Bancroft CC, Chen Z, Yeh J, Sunwoo JB, Yeh NT, Jackson S, Jackson C, Van Waes C. Effects of pharmacologic antagonists of epidermal growth factor receptor, PI3K and MEK signal kinases on NF-kappaB and AP-1 activation and IL-8 and VEGF expression in human head and neck squamous cell carcinoma lines. *Int J Cancer* 2003; 99:538-48.
50. Hirata A, Ogawa S, Kometani T, Kuwano T, Naito S, Kuwano M, Ono M. ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res* 2002; 62:2554-60.



51. van Heeckeren AM, Schluchter MD. Murine models of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Lab Anim* 2002; 36:291-312.
52. Morissette C, Skamene E, Gervais F. Endobronchial inflammation following *Pseudomonas aeruginosa* infection in resistant and susceptible strains of mice. *Infect Immun* 1995; 63:1718-24.
53. Starke JR, Edwards MS, Langston C, Baker CJ. A mouse model of chronic pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia*. *Pediatr Res* 1987; 22:698-702.
54. Stevenson MM, Kondratieva TK, Apt AS, Tam MF, Skamene E. In vitro and in vivo T cell responses in mice during bronchopulmonary infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Exp Immunol* 1995; 99:98-105.
55. Moser C, Johansen HK, Song Z, Hougen HP, Rygaard J, Hoiby N. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is more severe in Th2 responding BALB/c mice compared to Th1 responding C3H/HeN mice. *APMIS* 1997; 105:838-42.
56. Ishii Y, Fujimoto S, Fukuda T. Gefitinib prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:550-6.
57. Bragonzi A, Worlitzsch D, Pier GB, Timpert P, Ulrich M, Hentzer M, Andersen JB, Givskov M, Conese M, Doring G. Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model. *J Infect Dis* 2005; 192:410-9.
58. Fuschillo S, De Felice A, Balzano G. Mucosal inflammation in idiopathic bronchiectasis: cellular and molecular mechanisms. *Eur Respir J* 2008; 31:396-406.
59. Nicotra MB, Rivera M, Dale AM, Shepherd R, Carter R. Clinical, pathophysiologic, and microbiologic characterization of bronchiectasis in an aging cohort. *Chest* 1995; 108:955-61.
60. Ribatti D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *Br J Haematol* 2005; 128:303-9.
61. Mura M, dos Santos CC, Stewart D, Liu M. Vascular endothelial growth factor and related molecules in acute lung injury. *J Appl Physiol* 2004; 97:1605-17.
62. Koyama S, Sato E, Tsukadaira A, Haniuda M, Numanami H, Kurai M, Nagai S, Izumi T. Vascular endothelial growth factor mRNA and protein expression in airway epithelial cell lines in vitro. *Eur Respir J* 2002; 20:1449-56.
63. Massion PP, Inoue H, Richman-Eisenstat J, Grunberger D, Jorens PG, Housset B, Pittet JF, Wiener-Kronish JP, Nadel JA. Novel *Pseudomonas* product stimulates interleukin-8 production in airway epithelial cells in vitro. *J Clin Invest* 1994; 93:26-32.

64. Burgel PR, Cardell LO, Ueki IF, Nadel JA. Intranasal steroids decrease eosinophils but not mucin expression in nasal polyps. *Eur Respir J* 2004; 24:594-600.
65. Burgel PR, Montani D, Danel C, Dusser DJ, Nadel JA. A morphometric study of mucins and small airway plugging in cystic fibrosis. *Thorax* 2007; 62:153-61.
66. Brusasco V, Dinh-Xuan AT. Stereology: a bridge to a better understanding of lung structure and function. *Eur Respir J* 2010; 35:477-8.
67. Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181:394-418.
68. Lee SY, Cho JY, Miller M, McElwain K, McElwain S, Sriramarao P, Raz E, Broide DH. Immunostimulatory DNA inhibits allergen-induced peribronchial angiogenesis in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:597-603.
69. Corne J, Chupp G, Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Chen Q, Ma B, Du Y, Roux F, McArdle J, Waxman AB, Elias JA. IL-13 stimulates vascular endothelial cell growth factor and protects against hyperoxic acute lung injury. *J Clin Invest* 2000; 106:783-91.
70. Varoga D, Paulsen F, Mentlein R, Fay J, Kurz B, Schutz R, Wruck C, Goldring MB, Pufe T. TLR-2-mediated induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage in septic joint disease. *J Pathol* 2006; 210:315-24.
71. Koff JL, Shao MX, Ueki IF, Nadel JA. Multiple TLRs activate EGFR via a signaling cascade to produce innate immune responses in airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 294:L1068-75.
72. Ezaki T, Baluk P, Thurston G, La Barbara A, Woo C, McDonald DM. Time course of endothelial cell proliferation and microvascular remodeling in chronic inflammation. *Am J Pathol* 2001; 158:2043-55.
73. Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:475-82.
74. Brinson GM, Noone PG, Mauro MA, Knowles MR, Yankaskas JR, Sandhu JS, Jaques PF. Bronchial artery embolization for the treatment of hemoptysis in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1951-8.
75. Flume PA, Yankaskas JR, Ebeling M, Hulseley T, Clark LL. Massive hemoptysis in cystic fibrosis. *Chest* 2005; 128:729-38.
76. Senger DR, Van De Water L. VEGF expression by epithelial and stromal cell compartments: resolving a controversy. *Am J Pathol* 2000; 157:1-3.
77. Psarras S, Volonaki E, Skevaki CL, Xatzipsalti M, Bossios A, Pratsinis H, Tsigkos S, Gourgiotis D, Constantopoulos AG, Papapetropoulos A, Saxoni-Papageorgiou P,

- Papadopoulos NG. Vascular endothelial growth factor-mediated induction of angiogenesis by human rhinoviruses. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:291-7.
78. Voelkel NF, Vandivier RW, Tuder RM. Vascular endothelial growth factor in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290:L209-21.
79. Ribatti D. The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review. *Angiogenesis* 2008; 11:215-21.
80. Eriksson A, Cao R, Pawliuk R, Berg SM, Tsang M, Zhou D, Fleet C, Tritsarlis K, Dissing S, Leboulch P, Cao Y. Placenta growth factor-1 antagonizes VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive PlGF-1/VEGF heterodimers. *Cancer Cell* 2002; 1:99-108.
81. Cao Y, Chen H, Zhou L, Chiang MK, Anand-Apte B, Weatherbee JA, Wang Y, Fang F, Flanagan JG, Tsang ML. Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1996; 271:3154-62.
82. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Shibuya M, Collen D, Conway EM, Carmeliet P. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003; 9:936-43.
83. Odorisio T, Schietroma C, Zaccaria ML, Cianfarani F, Tiveron C, Tatangelo L, Failla CM, Zambruno G. Mice overexpressing placenta growth factor exhibit increased vascularization and vessel permeability. *J Cell Sci* 2002; 115:2559-67.
84. Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H, Berger M. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:2111-8.
85. Fong GH. Regulation of angiogenesis by oxygen sensing mechanisms. *J Mol Med* 2009; 87:549-60.
86. Berend N, Skoog C, Waszkiewicz L, Thurlbeck WM. Maximum volumes in excised human lungs: effects of age, emphysema, and formalin inflation. *Thorax* 1980; 35:859-64.
87. Dif F, Wu YZ, Burgel PR, Ollero M, Leduc D, Aarbiou J, Borot F, Gacria-Verdugo I, Martin C, Chignard M, Israel-Biet D, Kita Y, Scholte BJ, Touqui L. Critical role of cytosolic phospholipase  $\alpha_2$  in bronchial mucus hyper-secretion in CFTR-deficient mice. *Eur Respir J* 2010; ahead of print.

88. Ma T, Thiagarajah JR, Yang H, Sonawane ND, Folli C, Galietta LJ, Verkman AS. Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *J Clin Invest* 2002; 110:1651-8.
89. Perez A, Issler AC, Cotton CU, Kelley TJ, Verkman AS, Davis PB. CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292:L383-95.
90. Bartling TR, Drumm ML. Oxidative stress causes IL8 promoter hyperacetylation in cystic fibrosis airway cell models. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; 40:58-65.
91. Chen J, Kinter M, Shank S, Cotton C, Kelley TJ, Ziady AG. Dysfunction of Nrf-2 in CF epithelia leads to excess intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and inflammatory cytokine production. *PLoS One* 2008; 3:e3367.
92. Lee HS, Myers A, Kim J. Vascular endothelial growth factor drives autocrine epithelial cell proliferation and survival in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180:1056-67.
93. Voynow JA, Fischer BM, Roberts BC, Proia AD. Basal-like cells constitute the proliferating cell population in cystic fibrosis airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:1013-8.
94. Guilbault C, Saeed Z, Downey GP, Radzioch D. Cystic fibrosis mouse models. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36:1-7.
95. Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, Rogan MP, Pezzulo AA, Karp PH, Itani OA, Kabel AC, Wohlford-Lenane CL, Davis GJ, Hanfland RA, Smith TL, Samuel M, Wax D, Murphy CN, Rieke A, Whitworth K, Uc A, Starner TD, Brogden KA, Shilyansky J, McCray PB, Jr., Zabner J, Prather RS, Welsh MJ. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science* 2008; 321:1837-41.

# CURRICULUM VITAE

## ***ETAT CIVIL ET COORDONNEES :***

Clémence Martin  
Née le 16 octobre 1976, en couple.  
7 rue Amélie  
75007 PARIS  
Tel : 06 60 61 31 48  
Fax : 01 44 41 23 33  
clemence.martin@cch.aphp.fr

## ***FONCTION ACTUELLE :***

Praticien attaché, pneumologue.  
Service de Pneumologie, Professeur Dusser, Hôpital Cochin, APHP, Paris.

## ***FORMATION MEDICALE :***

**Premier et deuxième cycle des Etudes Médicales :** Université Pierre et Marie Curie, Faculté Pitié-Salpêtrière 1993- 2000.

**Concours de l'Internat :** Juin 2000. Spécialités Médicales. Région Ile de France.

**Internat en spécialité médicale (Pneumologie) :** Nov. 2000 - Nov. 2004

**Diplôme d'Etudes Spécialisées (DES) de Pneumologie :** Septembre 2005, mention TB.

**Diplôme de Doctorat en Médecine:** Octobre 2005. Titre : Caractéristiques et pronostic des patients atteints de pneumocystoses sévères admis en réanimation. Rôle de l'immunodépression sous jacente et place de la ventilation non invasive.

## ***Clinicat :***

Nov. 2005-Nov. 2007 : Assistant hospitalo-universitaire dans le service d'Explorations Fonctionnelles Respiratoires, Professeur A.T. Dinh-Xuan, Hôpital Cochin, APHP, Paris.

Nov. 2007-Nov. 2009 : Chef de Clinique dans le service de Pneumologie, Professeur Dusser, Hôpital Cochin, APHP, Paris.

## **FORMATION SCIENTIFIQUE**

**DEA de Biologie et Physiologie de la Respiration et de la Circulation** (option Respiration): Année universitaire 2004-2005. Laboratoire UPRES EA 2511, Hôpital Cochin, Paris. Titre : Rôle du Récepteur de l'Epidermal Growth Factor dans la synthèse de mucines par l'épithélium des polypes naso-sinusiens.

**Thèse de Doctorat de Sciences de la Vie et du Développement**, Université Paris XII.

Laboratoire UPRES EA2511, Hôpital Cochin, Paris. Titre : Mécanismes de l'angiogenèse bronchique et de la synthèse de VEGF par l'épithélium respiratoire dans les dilatations des bronches. Thèse débutée en nov. 2005, soutenance prévue le 06 décembre 2010.

## **PRESENTATIONS ORALES ET POSTERS**

**Martin C**, Escudier E, Coste A, Dusser D, Burgel PR. Rôle du récepteur de l'Epidermal growth factor dans la synthèse de mucines par l'épithélium des polypes naso-sinusiens. Affiche, Congrès de Pneumologie de Langue Française, 2006.

**Martin C**, Danel S, Escudier E, Coste A, Dusser D, Burgel PR. Régulation de la synthèse de VEGF<sub>165</sub> dans l'épithélium respiratoire par le LPS de *Pseudomonas aeruginosa* : Rôle du récepteur de l'EGF. Affiche, Journées des jeunes chercheurs de VLM, 2006.

**Martin C**, Danel S, Escudier E, Coste A, Fajac I, Dusser D, Burgel PR. Régulation de la synthèse de VEGF<sub>165</sub> dans l'épithélium respiratoire par le LPS de *Pseudomonas aeruginosa*: Rôle du récepteur de l'EGF. Affiche, J2R 2006.

Danel S, **Martin C**, Dusser D, Burgel PR. Hypervascularisation péri bronchiolaire dans la mucoviscidose: surexpression épithéliale de VEGF<sub>165</sub> et régulation par *Pseudomonas aeruginosa*, Présentation orale, J2R 2006.

**Martin C**, Shao MXG, Danel S, Escudier E, Coste A, Fajac I, Dusser D, Nadel J, Burgel PR. *Pseudomonas aeruginosa* secreted products induce VEGF-A synthesis via coordinated surface signaling in airway epithelium. Présentation orale, 1<sup>st</sup> European CF Young Investigator Meeting, 2007.

**Martin C**, Shao MXG, Danel S, Escudier E, Coste A, Fajac I, Dusser D, Nadel J, Burgel PR. *Pseudomonas aeruginosa* secreted products induce VEGF-A synthesis via coordinated surface signaling in airway epithelium. Affiche, CFF, 2007.

**Martin C**, Shao MXG, Danel S, Escudier E, Coste A, Fajac I, Dusser D, Nadel JA, Burgel PR. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* (PA) induisent la synthèse de VEGF-A par activation d'une cascade de mécanismes à la surface de l'épithélium respiratoire. Affiche, J2R, 2007.

**Martin C**, Danel-Beaucaire S, Chapron-Fouché J, Escudier E, Coste A, Dusser D, Nadel JA, Fajac I et Burgel P-R. *Pseudomonas aeruginosa* (PA) induit la synthèse du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) dans les cellules épithéliales bronchiques par activation

du récepteur de l'Epidermal Growth Factor (EGFR) indépendamment de la voie MyD88. Affiche, VLM, 2009.

**Martin C**, Thévenot G, Danel S, Chapron J, Tazi A, Macey J, Dusser D, Fajac I et Burgel P-R. L'infection bronchique a *Pseudomonas aeruginosa* induit la synthèse de vegf par l'épithélium respiratoire in vitro et in vivo chez la souris. Relation avec l'angiogenèse bronchique. Communication orale, J2R, 2010.

## **PUBLICATIONS**

1. Almolki A, Guenegou A, Golda S, Boyer L, Benallaoua M, Amara N, Bachoual R, **Martin C**, Rannou F, Dulak J, Burgel PR, El-Benna J, Leynaert B, Aubier M, Boczkowski J. Heme oxygenase-1 prevents airway mucus hypersecretion induced by cigarette smoke in rodents and humans *Am J Pathol* 2008; 173: 983-994 (Impact factor: 5,70)
2. Lazard DS, Moore A, Hupertan V, **Martin C**, Escabasse V, Dreyfus P, Burgel PR, Amselem S, Escudier E, Coste A. Muco-ciliary differentiation of epithelial cells is decreased after wound healing in vitro. *Allergy* 2009; 64: 1136-1143 (Impact factor 6,20)
3. Dif F, Wu YZ, Burgel PR, Ollero M, Leduc D, Aarbiou J, Borot F, Garcia-Verdugo I, **Martin C**, Chignard M, Israel-Biet D, Kita Y, Scholte BJ, Touqui L. Critical role of cytosolic phospholipase A2 in bronchial mucus hypersecretion in cfr-deficient mice. *Eur Resp J* 2010; sous presse,(impact factor: 5,54)
4. Burgel PR, **Martin C**. Mucus hypersecretion in COPD: should we only rely on symptoms? *Eur Resp Rev* 2010; 19: 94-6. (éditorial)
5. **Martin C**, Thévenot G, Danel S, Chapron J, Tazi A, Macey J, Dusser D, Fajac I and Burgel P-R. *Pseudomonas aeruginosa* induces VEGF synthesis in airway epithelium in vitro and in vivo. Possible relevance to peribronchial angiogenesis. *Eur Resp J* 2010 ; en révision 27 septembre 2010.
6. Morand PC, Burgel P-R, Carlotti A, Desmazes-Dufeu N, Farhi D., Kanaan R, **Martin C**, Mangliavori L, Dusser D J, Poyart C, Hubert D. Mediastinal tuberculosis in an adult patient with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*; sous presse (novembre 2010)
7. **Martin C**, Sarcome de l'artère pulmonaire. 22 diagnostics difficiles en pneumologie, 2010.
8. Bally C, **Martin C**, Kraoua S, Kanaan R, Lacronique J, Dusser D, Burgel P-R. Une pleurésie à éosinophiles liée à la prise d'acide valproïque. *Rev Pneumol Clin*. 2010 Nov. (sous presse)

### ***AUTRES ACTIVITES***

Stage d'aide soignante dans un dispensaire (enfants handicapés, adultes en fin de vie et HIV positifs) de Mère Teresa à Mumbai (Inde): été 1994.

École à l'hôpital: \_ 1996 à 1997. Matières enseignées : anglais, italien et biologie.

Apiculture.

Elevage de chevaux percherons.

### ***SEJOURS A L'ETRANGER***

Pays-Bas et Angleterre (1977-1983)

Côte d'Ivoire (1986-1989)

Italie (1989-1992)

### ***LANGUES PARLEES***

Bilingue anglais et italien.

Entretien une conversation en espagnol.